AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 10 — N.º 1

1948

Estação Agronómica Nacional

PORTUGAL

Composição e impressão das Oficinas
da Tip. Alcobacense, Lt.ª — Alcobaça

AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 10 — N.º 1

1948

ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL

QUINTA DA ALDEIA - SACAVÉM

PORTUGAL

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
17 OCT 1950

DE FLORA LUSITANA COMMENTARII

AD NORMAN HERBARII STATIONIS AGRONOMICAE NATIONALIS

AB A. R. PINTO DA SILVA EDITII

FASC. III *MARTIO 1948*

QUIZ o Senhor Engenheiro VAN SOEST, insigne botânico e conhecido especialista dos difíceis grupos que são *Taraxacum* e *Hieracium*, dar-nos o seu precioso concurso, prestando-se amàvelmente a rever o material de tais géneros arquivado no herbário da Estação Agronómica Nacional e devido principalmente às colheitas do antigo conservador do herbário da Escola Politécnica de Lisboa, A. R. DA CUNHA, e àquelas que ROTHMALER realizou enquanto esteve na referida Estação.

Tanto *Taraxacum* como *Hieracium* não estão tratados nas obras portuguesas sobre a nossa Flora à altura das investigações taxonomicas realizadas desde algumas dezenas de anos. Não deve surpreender, portanto, que grande número de novidades venha a assinalar-se, em grupos que, mesmo naqueles países onde têm sido largamente estudados, ainda se mostram prometedores.

O estudo das colecções do nosso herbário, ainda que exiguas, revelou elevado número de novidades, em vários níveis, coroando de êxito o cuidadoso trabalho que o Sr. Eng. VAN SOEST nos deu a honra de inserir nas páginas dos *Commentarii*, e que ilustrou com fiéis e expressivos desenhos da autoria da senhora VAN SOEST-WIJTMAN, sua Esposa.

Os nossos agradecimentos.

A. R. Pinto da Silva

SUR QUELQUES *TARAXACA* ET *HIERACIA* DU PORTUGAL

PAR *J. L. VAN SOEST*

I

Taraxacum Nordstedtii **Dahlstedt**, Västsvenska Taraxaca, *Ark. f. Bot.* **10** (11): 27 (1911); Tar. VIII (Spectabilia), *Kungl. Svenska Vet. Ak. Handl.* III 9 No 292 (1930); RAUNKIAER, *Dansk Eksk. Fl.* 5e Ed.: 315 (1934); G. E. HAGLUND, *Bot. Notiser.*: 434 (1935); v. SOEST, *Ned. Kruidk. Arch.* 52: 228 (1942).

Le groupe des *Spectabilia* a son aréal dans les contrées boréales (Fig. 1).

Taraxacum Nordstedtii (Fig. 2) paraît être commun ou assez commun dans la Suède méridionale, le Danemarc, la Hollande et l'Angleterre méridionale; il pénètre un peu dans l'Europe centrale, est encore trouvé en Belgique, en France et dans l'Irlande; dans tous ces derniers pays la fréquence n'est pas bien connue. En tout cas, c'était une surprise de trouver dans l'herbier de la Station Agronomique Nationale du matériel de cette espèce de:

Beira Litoral: in graminosis ad margines viarum prope Luso, 200 *m.s.m.* (ROTHMALER 14673: LISE 6413).

Il serait bien intéressant de savoir dans quelle unité sociologique elle y est trouvée; en Hollande elle appartient au *Molinion coeruleae* et elle est, en général, accompagnée d'espèces de *Carex* et *Juncus*.

Un deuxième endroit de *T. Nordstedtii* (dans une forme naine et critique) est:

Trás-os-Montes: Montalegre, *in pratis humidis pr.* Vila da Ponte, *solo schistoso*, 800 *m.s.m.* (ROTHMALER 15619: LISE 6487).

Tandis que *T. Nordstedtii* est une plante des plaines marécageuses de l'Europe boréale, il semble qu'elle cherche, dans les contrées plus méridionales, les collines et les montagnes.

Sous le même n.° 6487 se trouve dans l'herbier de la Station Agronomique Nationale une plante, qui est différente de ce qu'on

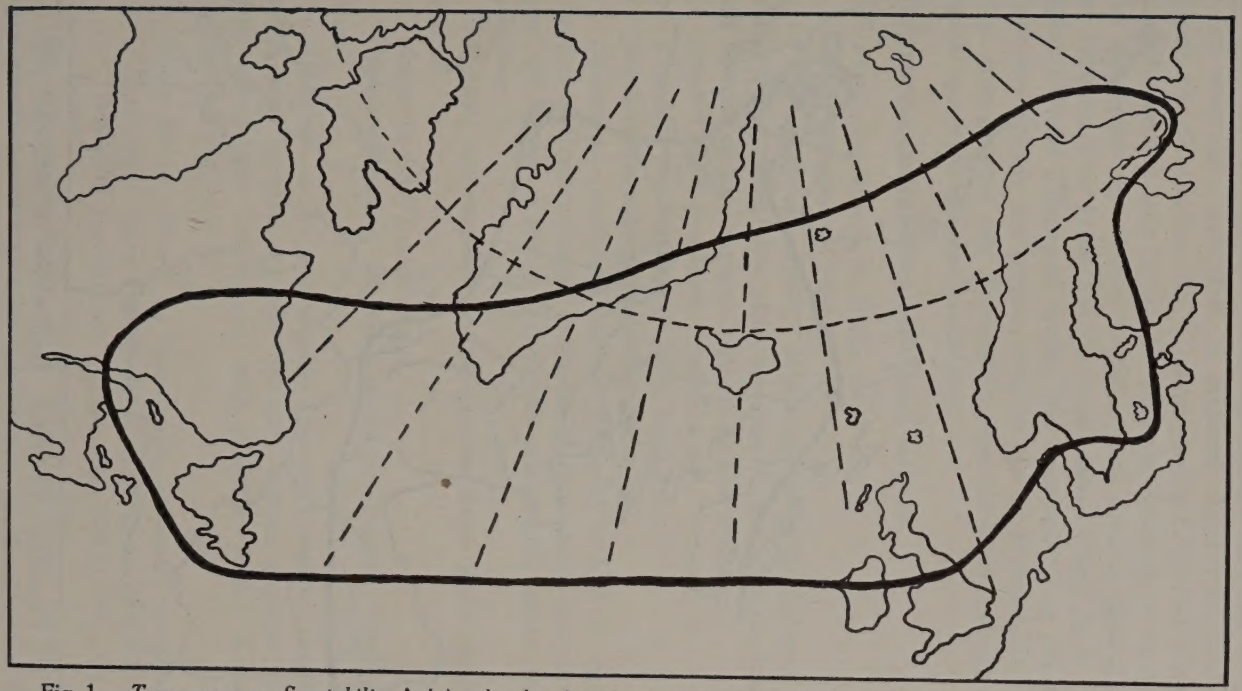


Fig. 1 — *Taraxacum* gr. *Spectabilia*. Aréal, selon les données de DAHLSTEDT. Trois espèces sont exclues : *T. praestans* Lindb. f. et *T. maculigerum* Lindb. f., n'étant pas typiques et ayant un aréal écarté, et *T. Nordstedtii* qui se conduit bien différemment en aréal et qui semble vicarier avec les vrais *Spectabilia*. (Cf. avec Fig. 2).

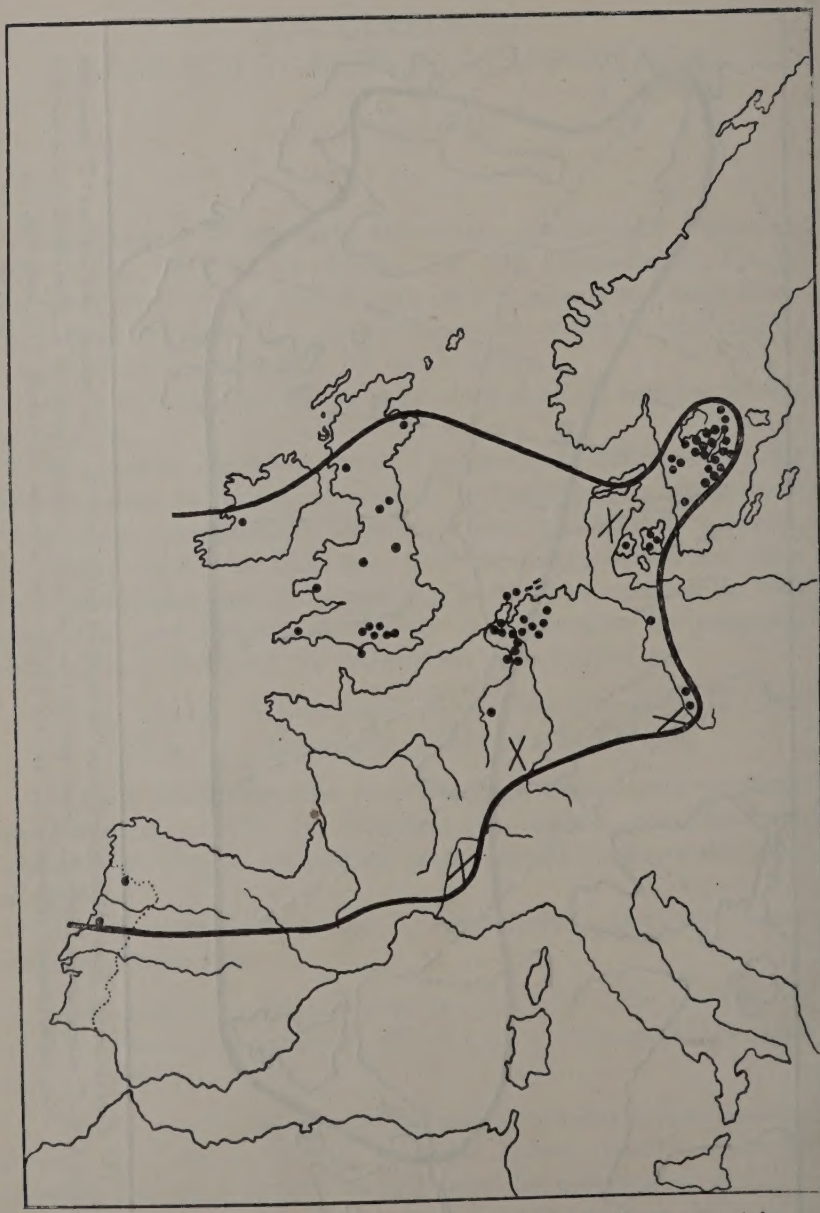


Fig. 2 — *Taraxacum Nordstedtii.* Aréal, suivant la littérature citée dans le texte et suivant les recherches faites dans de divers herbiers.

entend sous *T. Nordstedtii*, mais qui semble être une autre espèce reliée avec elle; cependant le matériel, étant trop incomplet, ne donne pas de solution. Le *T. udum* Jordan (*Pugillus Plant.*, 1852) semble être une telle forme. Et aussi en Hollande et en Angleterre j'ai rencontré des formes critiques soit dans la nature, soit dans les herbiers. Une étude des *Taraxaca* dans l'Ouest de la France et dans le Nord d'Espagne serait bien nécessaire à ce point de vue. Peut-être toutes ces formes, avec le vrai *T. Nordstedtii*, font part d'un sous-groupe des *Spectabilia* avec un aréal distinct et moins boréal que celui des *eu-Spectabilia*.

Taraxacum lusitanicum* van Soest, *nov. sp.

Planta mediocria, 5-10 cm alta.

Radix simplex vel furcata.

Folia gramineo-viridia, subtus glabrescens (planta ceterum glabra), lingulata, lobis triangularibus obtusis integris, lobo terminali hamato obtuso integro, petiolis pallide roseis.

Scapi (2) 6-8 cm foliis ± aequilongi.

Capitula mediocria (2,5-3 cm lata).

Involucra subobscure viridia basi ovata.

Squamae exteriores breves (1,5-2,5 × 3,25-5 mm) laxe adpressae ± immarginatae ± ciliatae obtusae apice purpureo-violaceae vel roseo-coloratae, inferiores marginatae apice purpureo-violaceae.

Ligulae saturate luteae, marginales extus stria canoviolacea notatae.

Antherae (± ?) polliniferae.

Stylus subluteus, stigmatibus longus (4 mm) fusco-virescentibus.

Achenium ca 3,3 mm longam fusco-stramineum, in pyramiden ca 0,6 mm longam conicam abrupte abiens, superne breve sed acute spinulosum ceterum p. max. p. laeve, rostro 6 mm longo, pappus (4,5 mm) albus.

Beira Baixa: Serra da Gardunha, *in pratis montanis humidiusculis supra* Castelo Novo, *solo granitico*, 700 *m.s.m.*, 5-V-1939 (ROTHMALER 15255: LISE 6455) (Fig. 3).

Elle me semble voisine de *T. Nordstedtii*, mais les petits fruits, outre d'autres caractères, indiquent qu'elle appartient à un autre

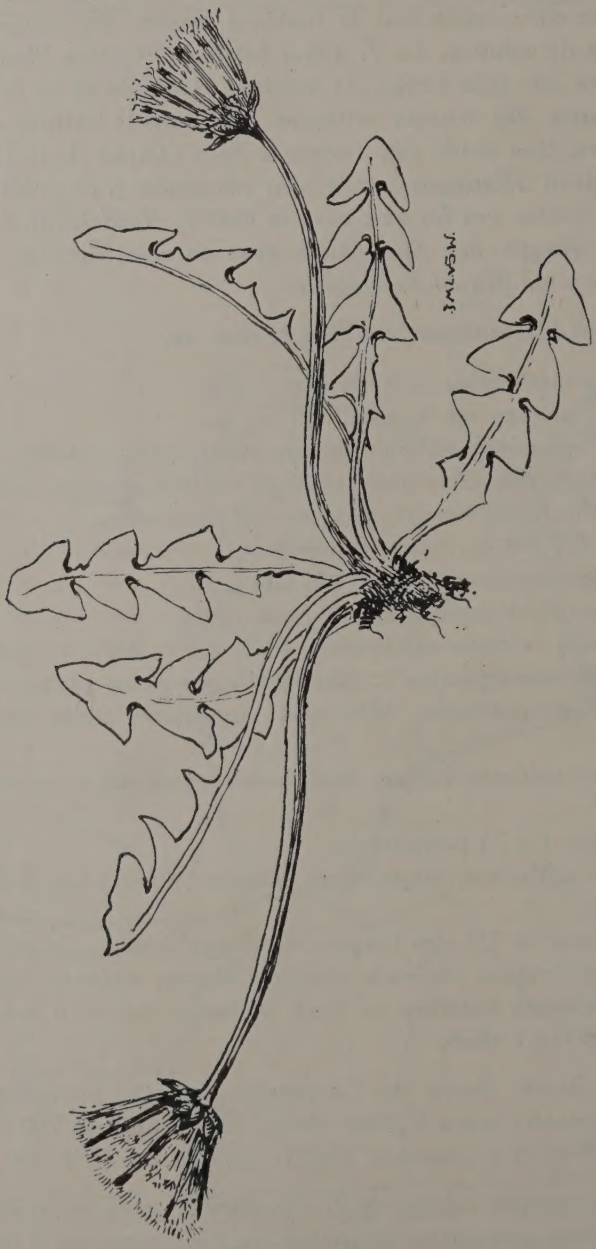


Fig. 3 — *Taraxacum lusitanicum* van Soest, nov. sp. — Habitus. ×1.

groupe de *Taraxaca*. Il faut remarquer les petites feuilles involucrales extérieures, à peu près tel que chez les *Taraxaca Alpina*, mais habituellement elle en diffère beaucoup.

Taraxacum triforme **van Soest, *nov. sp.* (*Grex Vulgaria* Dahlst.)**

Planta mediocria ca 11 cm alta.

Radix tenuis.

Folia suberecta, breve rubropetiolata, luteo-viridia subtus praesertim in nervo mediana ± hirsutula vel glabriuscula, ovato-lanceolata vel subovata, lobis lateralibus parvis denticulatis acutis ± retroversis, terminalis magnis ovatis subsagittatis subintegribus vel raro incisis lateribus insertis, apice rotundatis.

Scapi foliis subaequilongi in inferiore parte parce pilosi supra glabri.

Capitula ca 2,5 cm.

Involucrum 13 mm.

Squamae exteriores biformes, in extremo parte adpressae vel apice ± retroversae ovatae (3 × 6-7 mm) anguste marginatae p. p. scariosae ± roseotinctae, in cetera parte lanceolatae (2 × 10-11mm) usque ad summam obscuram ± tortilem angustissime marginatae, interiores lineares virides p. p. marginatae.

Ligulae luteae, marginales extus stria fusco-violacea notatae.

Antherae polline carentes (?).

Stylus et *stigmata* subobscuri.

Achenia matura ignota.

Algarve: Monchique, *in castaneetis montis* Picota, *solo granitico*, 19-IV-1939 (ROTHMALER 14907: LISE 6437, p. p.). (Fig. 4).

Taraxacum algarbiense **van Soest, *nov. sp.* (*Grex Vulgaria* Dahlst.).**

Planta humilia (4 cm).

Radix crassa furcata.

Folia procumbentia, luteo-viridia 6 cm longa subtus glabrescentia (tota planta ceterum glabra) ovato-lanceolata, lobis paucis ± deltoideis valde retroversis, inferioribus (1-2) parvis, superiori-

Fig. 4 — *Taraxacum triforme* van Soest, nov. sp.—Habitus. × 3/4.

bus (1-2) brevis acutis integris vel paucidentatis, lobo terminali elongato hastato-sagittato integro vel pauci retroversodentato.

Scapi florendi tempore foliis multo (?) breviores.

Capitula mediocria.

Involucrum pallide viride, basi subtruncatum.

Squamae exteriores (1,5-2 × 4-7 mm) lineari-lanceolatae laxe patentes, p. p. anguste roseolo-marginatae ± ciliatae apicem versus roseolo-coloratae, inferiores marginatae apice ± purpureo-violaceae.

Fig. 5 — *Taraxacum algarbiense* van Soest, nov. sp. — Habitus × 1.

Ligulae luteae (p. p. tubulosae ?), marginales extus stria fusco-violacea notatae.

Antherae polline carentes (?).

Stylus et *stigmata* sublutei.

Achenia matura ignota.

Algarve: Monchique, *in castaneetis montis* Picota, *solo granitico,* 19-IV-1939 (ROTHMALER 14907: LISE 6437 p.p.) (Fig. 5).

Il serait bien nécessaire de récolter plus de plantes de ces deux

espèces, en notant les couleurs de la plante vivante, telles que celles des fleurs, des feuilles, des fruits, et puis d'étudier la variation, en dimensions, des plantes.

Il-y-a une certaine relation entre *T. triforme*, *T. algarbiense* et quelques formes que j'ai vu dans la région méditerranéenne occidentale sans tirer la conclusion s'ils forment un sousgroupe bien-déterminé des *Taraxaca Vulgaria.*

Taraxacum lacistophyllum **Dahlstedt**, *Ark. f. Bot.* **10** (11): 21 (1911); *Acta Flor. Suecicae.* **1**: 77 (1921); *T. erythrospermum* ssp. *lacistophyllum* Dahlstedt, *Bot. Notiser*: 168 (1905).

Cette espèce appartient au groupe des *Taraxaca Erythrosperma*, qui est répandu dans toute l'Europe et qui au reste n'est que rare; entre autres, quelques espèces croissent encore dans l'extrême Nordouest de l'Afrique.

Taraxacum lacistophyllum, lui même, est assez commun dans les régions méridionales des pays scandinaves et on l'a trouvé en certaines localités dans l'Europe centrale, p. e., la Suisse. En Angleterre et en Hollande il est commun; la distribution de cette espèce en France et en Espagne n'est pas connue.

Dans le spécimen 6502 de l'herbier de la Station Agronomique Nationale on trouve une plante de Trás-os-Montes: Bragança, *ad vias montis* Serra de Nogueira pr. Rebordãos, 1000 *m.s.m.* (ROTHMALER *et* P. SILVA 15786), qui appartient à *T. lacistophyllum*, ou, en tout cas, n'en diffère que très peu.

Une autre espèce du groupe des *Erythrosperma* a été trouvée au Portugal: Torres Novas, Casas Altas, en 1886, par A. R. DA CUNHA, mais elle est insuffisamment recoltée pour la reconnaître.

Selon la *Flora de Portugal* de PEREIRA COUTINHO, le *Taraxacum officinale* ssp. *laevigatum* (DC.) est cité pour le pays, mais le *laevigatum* est très hétérogène et se compose — selon les idées des auteurs scandinaves — de trois groupes d'espèces: les *Dissimilia*, les *Erythrosperma* et les *Eu-erythrocarpa.* Le premier groupe se distingue des deux autres par les akènes bruns, non rouges ou rougeâtres; les *Erythrocarpa s. str.* sont de beaucoup plus grande taille que les *Erythrosperma* et ils ont de plus grands akènes.

Les *Dissimilia* ne sont pas encore constatés dans l'Europe

méridionale; les *eu-Erythrocarpa*, tout au contraire, y sont limités. En Espagne, le *T. stenospermum* (SENNEN n.° 5351), recolté dans les environs de Barcelona, y appartient.

II

Hieracium Peleterianum **Mérat, ssp.** ***Peleterianum*** **Naegeli et Peter.**

MÉRAT, *Nouv. Fl. Paris:* 305 (1812); NAEGELI *et* PETER, *Hier. Mitt. Eur., Piloselloïden.:* 127 (1885); ZAHN *in* ENGLER, *Pflanzenr.*, **4** (280): 1156 (1923); ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *Syn. mitteleur. Fl.*, **12** (1): 20 (1930).

Cette espèce est répandue dans l'Europe occidentale (Fig. 6); elle atteint l'Europe boréale dans les pays scandinaves, la Finlande et la péninsule de Kola (Russie); elle s'étend jusqu'à la région méditerranéenne, habitant les montagnes. En donnant dans le *Pflanzenreich* (fig. 80, p. 1150) une carte un peu schématique, ZAHN comprend le Portugal entier dans l'aréal, mais il ne donne aucune localité dans ses listes; pour l'Espagne il ne mentionne que la sousespèce *pinaricum* Zahn, ayant e. a. les involucres glanduleux et poilus.

Dans l'herbier de la Station Agronomique Nationale se trouve un *Hieracium* indéterminé: *Trás-os-Montes*: Vinhaes, *in herbosis schistosis versus* Valpassos, 600 *m.s.m.* (ROTHMALER *et* P. SILVA 15740: LISE 6499). Ces plantes représentent, sans doute, le type de *H. Peleterianum*, ayant les involucres seulement poilus.

On le distingue des espèces voisines *(H. pilosella, H. pseudo-pilosella)* par les folioles involucrales larges à la base et surtout par les stolons courts et épais, munis de grandes feuilles, tandis que les autres espèces ont les folioles moins larges et les stolons plus élargis, plus minces et munis de petites feuilles.

H. Peleterianum est mentionné dans la *Flora de Portugal*, de PEREIRA COUTINHO, pour Montalegre, d'où je n'ai pas vu toutefois des plantes; il faut, en tout cas, avoir une certaine prudence avec les formes mal evoluées de *H. Pilosella*, etc., qui sont parfois dépourvues de stolons; dans ce cas on peut généralement les reconnaître par leurs dimensions réduites, par la forme des folioles involucrales

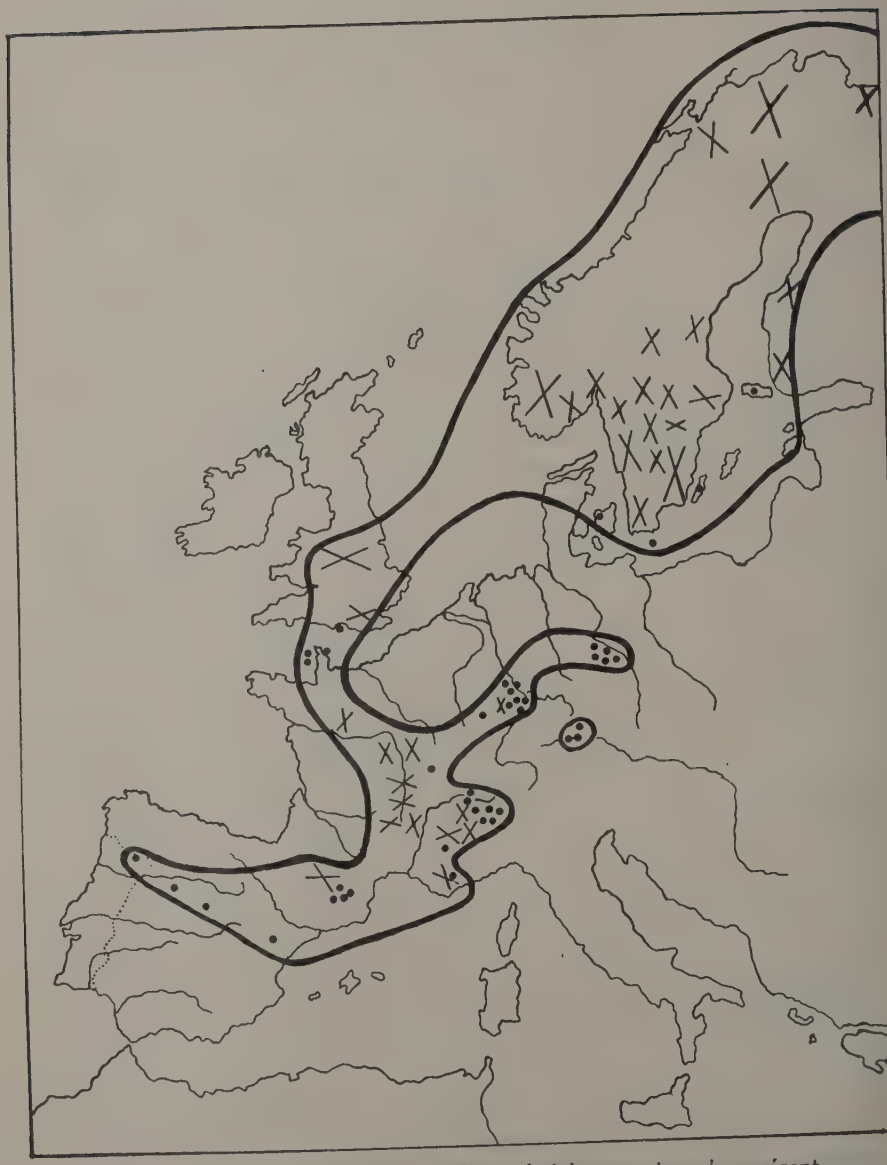


Fig. 6 — *Hieracium Peleterianum* Mérat. Aréal connu jusqu'au présent.

et par l'indument; *H. pilosella* a presque toujours les folioles plus ou moins glanduleuses.

Il me semble que *H. Peleterianum* est limité à la moitié septentrionale de la péninsule Iberique.

Hieracium pseudopilosella **Tenore**, *Syll. pl. Neapol.*: 399 (1831); ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 1184; *H. pilosella* L. var. *pulchellum* Scheele (1863) *nec H. pulchellum* Grenier (1850).

ssp. *tenuicaule* **Naegeli et Peter**, *l. c.*: 176; ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 1185.

C'est la forme normale des régions méditerranéennes de la France, de l'Espagne et du Portugal, avec les involucres clairement poilus et dépourvus de poils glanduleux; elle est déjà indiquée dans les Flores portugaises sous le nom de var. *pulchellum* de *H. pilosella*, espèce qui est, néanmoins, spécifiquement différente. Dans l'involucre, l'indument des poils n'est jamais tellement evolué chez *H. pilosella* que dans ce cas là et les formes de *H. pilosella* sans poils glanduleux sur la tige et sur les folioles involucrales sont extrêmement rares. La ssp. *tenuicaule*, déjà mentionnée par ZAHN pour le Portugal, semble y être assez répandue. (1)

ssp. *plantaginoides* **Naegeli et Peter**, *l. c.*: 176; ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 1185.

Elle diffère de la précédente par les caractères suivants: feuilles plus elliptiques et obtuses, involucre plus grand (13 mm), stolons assez épais.

On trouve, sous le nom de *H. pilosella*, dans l'herbier de A. R. DA CUNHA (LISE 12052, p. p.): Tapada do Monteiro, Vilar

(1) Suivant l'auteur de cet article, font part de cette sousespèce les spécimens:

Minho: Lindoso, pr. Monte Rebordo, *ca.* 1000 *m. s. m.* (P. SILVA, FONTES, MYRE *et* RAINHA: LISE 17563).

Trás-os-Montes: Serra do Larouco, *ca.* 1500 *m. s. m.* (G. PEDRO *et* MYRE: LISE 9317); Serra do Brunheiro (MOLLER, *Soc. Brot.* 1432: LISE 12051, p. p.).

Beira Alta: Vilar Formoso, Tapada do Monteiro (A. R. DA CUNHA: LISE 12052, p. p.). (Note de l'éditeur)

Formoso, le *H. pseudopilosella*, dont une partie se rapporte à la ssp. *plantaginoides* (1). Cette sousespèce, au reste, est connue du Piemont et des Basses Alpes, mais il faut bien mentionner que ZAHN, dans une notice, écrit: «huc pertinere videtur *H. Portae* Willk. (1893)... Murcia».

Hieracium pilosella* L. ssp. *subparviflorum ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 1176; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 48; ssp. *parviflorum* Naegeli et Peter, *l. c.*: 153, *nec* Link (1822).

Tandis que *H. pseudopilosella* est une plante des régions mediterranéennes, *H. pilosella* y est rare et, probablement, on le trouvera au Portugal seulement dans la partie extrêmement septentrionale. L'herbier de la Station Agronomique Nationale contient une plante de la ssp. *subparviflorum*, recueillie à Trás-os-Montes: Chaves, Serra do Brunheiro, S. Lourenço (MOLLER, *Fl. Lusit.* 1432: LISE 12051, p.p.) jointe à *H. pseudopilosella*: elle s'en distingue aisément par l'indument de l'involucre et de la tige richement glanduleux et avec des poils simples rares.

Il serait d'importance de savoir l'aréal du vrai *H. pilosella* au Portugal.

Clef des Piloselloïdes

(*H. castellanum* B. et R. (2), pas rare dans les provinces septentrionales du pays, appartient au groupe des *Castellanina*).

(1) M. van SOEST a, aussi, inclu dans cette sousespèce l'exemplaire trouvé à Vilar Formoso, Folha da Atalaya (A. R. DA CUNHA: LISE 12053).

(Note de l'éditeur)

(2) M. van SOEST a determiné dans cette espèce les spécimens suivants:

Trás-os-Montes: Montalegre, S. Pedro (MOLLER, *Fl. Lusit. Exsicc.* 1045: LISE 12054); *ibid.*, entre Donões e Montalegre, *ca.* 950 *m. s. m.* (G. PEDRO *et* MYRE: LISE 9378); *ibid.*, Medeiros, *ca.* 1060 *m. s. m.* (G. PEDRO: LISE 9306); Chaves, Serra do Brunheiro, S. Lourenço (MOLLER, *Soc. Brot.* 1431: LISE 12055).

Beira Alta: Serra da Estrela, *pr.* Lagoa da Paixão (A. R. DA CUNHA: LISE 12056); *ibid.*, Fraga da Cruz (A. R. DA CUNHA: LISE 12057); *ibid.*, Cântaros (A. R. DA CUNHA: LISE 12058).

Beira Baixa: in graminosis montium Serra da Gardunha *supra* Alpedrinha, *solo granitico*, 1000-1200 *m. s. m.* (ROTHMALER 13834: LISE 6352).

(Note de l'éditeur)

1. Folioles de l'involucre larges (plus de 1,5 mm. à la base). Stolons courts, épais, munis de grandes feuilles..... ..... *H. Peleterianum*
   Folioles de l'involucre moins larges. Stolons le plus souvent grêles et allongés, munis de petites feuilles 2
2. Tige munie de poils glanduleux (et souvent de poils simples), involucre muni de poils simples et glanduleux en quantité très variable, parfois sans poils simples (et très glanduleux), parfois sans poils glanduleux (et très poilu)..... ..... *H. pilosella*
   Tige munie de poils simples, involucre très richement poilu; poils glanduleux 0. 3
3. Feuilles sur la face supérieure non floconneuses .... *H. pseudopilosella*
   Feuilles sur la face supérieure floconneuses (1) *H. subuliferum*

Hieracium pallidum **Bivona-Bernardi f.** (1813) — ZAHN *in* ENGLER, *Pflanzenr.* **4** (280) : 213 (1920); ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *Syn. mitteleur. Fl.* **12** (2) : 243 (1931).

La ssp. *comosulum* Arvet-Touvet est mentionnée dans la *Flora de Portugal*, par PEREIRA COUTINHO (2), mais, selon l'herbier de la Station Agronomique Nationale que j'ai vu, encore d'autres sous-espèces croissent au Portugal: ssp. *brunelliforme* et ssp. *comatulum*. Elles se distinguent aisément de la ssp. *comosulum*, la première ayant les feuilles plus dentées, et la seconde, parce qu'elle n'a pas de poils étoilés (floconneux) à la face inférieure des feuilles.

ssp. *brunelliforme* **Arvet-Touvet**, *Suppl. Mon.*: 18 (1876), *pro sp.*; ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 215, *pro var.*; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 258, *pro ssp.*

Beira Alta: Castelo Mendo, Moita do Carvalho (A. R. DA CUNHA: LISE 11384).

---

(1) Le *H. subuliferum* N. P., pas mentionné pour le Portugal, est à rechercher dans la province de l'Algarve et aussi, peut-être, en quelques autres contrées du Portugal.

(2) Selon M. van SOEST, appartient, *pro parte*, à la ssp. *comosulum* le n.º 76 de la *Fl. Lusit. Exs.*, qui est dans l'herbier de la E. A. N., recueilli par MOLLER à Serra da Estrela, Poio Negro. (Note de l'éditeur)

ssp. *comatulum* **Jordan ex Boreau,** *Fl. Centre France.*, 3e ed., 2: 410 (1857), *p. p., pro sp.;* ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 214; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 245.

Beira Alta: Serra da Estrela, *in fissuris rupium graniticorum umbrosis montis* Cântaro Magro, 1800 *m. s. m.* (ROTHMALER 13721: LISE 6346).

Probablement, d'autres sousespèces de *H. pallidum* seront trouvées au Portugal et, dans ce cas, il sera nécessaire de comparer les ouvrages de ZAHN cités.

Hieracium praecox **Schultz-Bip.,** *Pollichia.* 8: 44 (1850); ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 231; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 267.

H. praecox est une espèce intermédiaire de *H. pallidum* et *H. murorum.* La dernière, très commune dans l'Europe centrale et boréale, est rare dans les régions méditerranéennes et sa présence au Portugal n'est pas encore sûre.

Le *Hieracium praecox* s'en distingue par les caractères suivants: bords des feuilles (souvent *glauques*) munis de *microglandes* parfois rares, hérissés de poils ± *raides*; ligules munies de *cils* parfois très courts; styles *jaunes* (obscures chez les formes typiques de *H. murorum*). Habituellement, il se rattache plus à *H. murorum* qu'à *H. pallidum,* qui montre les caractères cités beaucoup plus parfaitement.

Dans l'herbier de la Station Agronomique Nationale j'ai rencontré deux sousespèces:

ssp. *bounophilum* **Jordan ex Boreau,** *l. c.:* 412, *pro sp.*; ZAHN *in* ENGLER, *l. c.:* 234; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 280.

Minho: Serra do Gerez, *in dumetis herbosis pr.* Albergaria, 500 *m. s. m.* (ROTHMALER 15549: LISE 6482).

Elle est caractérisée par ses feuilles ovales, ± arrondies ou à peine tronquées à la base, dépourvues de flocons au dessous, etc. (Cf. ZAHN pour la description complète).

ssp. *basalticum* **Schultz-Bip.,** *l. c.:* 35, *pro var.*; ZAHN *in* ENGLER, *l. c.:* 233; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.:* 272.

Beira Alta: Serra da Estrela, 1) *in fissuris rupium graniticorum umbrosis ad basin montis* Cântaro Magro, 1800 *m. s. m.* (ROTHMALER 13720: LISE 6345); 2) *in fissuris rupium graniticorum ad ima montis* Cântaro Magro, 1800 *m. s. m.* (ROTHMALER 13719: LISE 6344); 3) *in rupestribus graniticis umbrosis inter* Penhas Douradas *et* Gouveia, 1500 *m. s. m.* (ROTHMALER 13759: LISE 6348).

Les plantes citées ne répondent pas tout-à-fait à la forme typique de la ssp. *basalticum*, qui a les feuilles très fortement dentées, presque laciniées à la base et les involucres et les pétioles moins glanduleux et moins poilus. Mais pour le reste elles sont en bonne accordance; le nerf dorsal des feuilles, p. e., est muni de poils étoilés. J'en fais la varieté:

var. *herminii* van Soest, nov. var. A *H. basaltico* typico differt foliis minus laciniatis vel profunde dentatis, involucris minus pilosis, cum pedicellis dense glandulosis. (*Typus:* LISE 6345).

Clef de quelques formes voisines de Hieracium pallidum

1. Involucre avec des poils glanduleux et étoilés; poils simples 0. ..... *H. murorum*
   Involucre poilu, souvent aussi glanduleux et floconneux... 2
2. Base de la plante fortement poilue; tige souvent rameuse dès la base et au moins sous la moitié de sa longueur..... ..... *H. bicolor* (1)
   Base de la plante pas fortement poilue; les feuilles et ses pétioles souvent très poilus..... 3
3. Poils au bord de la feuille un peu raides; feuilles assez minces..... *H. praecox*
   Feuilles ovales, ± arrondies à la base, dépourvues de poils étoilés sur la nervure dorsale.... ssp. *bounophilum*
   Feuilles allongées, tronquées ou un peu contractées à la base, munies de poils étoilés sur la nervure dorsale .... ssp. *basalticum*

(1) *H. bicolor* Scheele ssp. *lusitanicum* (A.-T.) Zahn est cité pour le Portugal.

Poils au bord de la feuille très raides, denses; feuilles raides. ..... *H. pallidum*

a. Feuilles sans poils étoilés sur la nervure dorsale, presque entières ou faiblement denticulées.. ssp. *comatulum*
Feuilles munies de poils étoilés sur la nervure dorsale... b

b. Feuilles presque entières; involucre muni de poils simples, étoilés et glanduleux, les derniers très fins..... ..... ssp. *comosulum*
Feuilles fortement dentées; involucre muni de poils simples, étoilés et glanduleux, les derniers assez longs ..... ssp. *brunelliforme*

Hieracium maculatum **Smith,** *Trans. Linn. Soc.* **9**: 239 (1808); ZAHN *in* ENGLER, *Pflanzenr.* 4 (280): 513 (1920); ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *Syn. mitteleur. Fl.* **12** (2): 499 (1934); *H. vulgatum auct. lusit. p. p.?*

ssp. ***divisum*** **Jordan ex Boreau** — JORDAN, *Cat. Dij.*: 21 (1848), *pro sp.*; BOREAU, *Fl. Centre France*, 3^e^ ed., **2**: 406 (1857); SUDRE, *Hier. Centre France.*: 62, t. XXI (1902); ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 516; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 505.

Beira Alta: Serra da Estrela, *in rupestribus umbrosis graniticis inter* Penhas Douradas *et* Gouveia, 1500 *m. s. m.* (ROTHMALER 13755: LISE 6347); *ibid., in herbosis ad margines rivulorum* (ROTHMALER 13761: LISE 6349).

ssp. ***commixtum*** **Jordan ex Boreau** — JORDAN, *l. c.*: 20; BOREAU, *l. c.*: 408; SUDRE, *l. c.*; 63, t. XIX; ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 519; ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 514.

Minho: Lindoso, Vale do Cabril, 350 *m. s. m.* (FONTES, MYRE *et* RAINHA: LISE 17551).

ssp. ***approximatum*** **Jordan ex Boreau** — JORDAN, *l. c.*: 20; BOREAU, *l. c.*: 403; SUDRE, *l. c.*: 59, t. XVIII; ZAHN *in* ENGLER, *l. c.*: 520; ssp. *eu-approximatum* ZAHN *in* ASCHERSON *et* GRAEBNER, *l. c.*: 516.

Dans l'herbier de A. R DA CUNHA, se trouvent, sous le nom de *H. vulgatum*, des plantes des localités suivantes: Alcaide, Sítio da Serra (LISE 11390); Serra da Estrela, Cântaros (LISE 11391);

Fundão, Cabeço de S. Braz (LISE 11392); Vilar Formoso, Alto da Raza (LISE 11389). Moins certain est le spécimen: Serra da Estrela, *in rupibus graniticis prope* Lagoa Comprida, 1500 *m. s. m.* (ROTHMALER 14056: LISE 6359).

H. maculatum est une espèce intermédiaire entre *H. praecox* et *H. vulgatum*; elle préfère comme habitat les régions temperées de l'Europe et elle s'étend plus vers le Sud que *H. vulgatum*. Souvent *H. maculatum* (ainsi que *H. praecox*) a les feuilles maculées; dans le matériel portugais, que j'ai vu, les tâches pourprées manquent.

H. maculatum se distingue de *H. vulgatum* par les caractères suivants: bords des feuilles hérissés de poils raides, feuilles souvent un peu glauques; tige plus feuillée que celle de *H. praecox*, et moins que celle de *H. vulgatum*.

Les trois sousespèces portugaises représentent des formes voisines à *H. vulgatum* et elles ont les tiges assez richement feuillées.

On peut attendre plus de sousespèces au Portugal, dont on trouvera les descriptions dans les ouvrages de ZAHN, etc. Pour les trois sousespèces, citées plus haut, la clef suivante suffit:

1. Inflorescence à rameaux courts (— 5 cm); feuilles dentées, mais jamais laciniées à la base 2
   Inflorescence à rameaux longs (— 12 cm); feuilles fortement dentées et souvent ± laciniées à la base... ssp. *divisum*
2. Feuilles d'un vert pâle, peu dentées..... ssp. *commixtum*
   Feuilles glauques, à dents triangulaires.. ssp. *approximatum*

ANÁLISE DA ACÇÃO DOS RAIOS-X SOBRE OS CROMOSOMAS DO *TRITICUM MONOCOCCUM* L.

POR *ALBERTO GARDÉ*
(Estação Agronómica Nacional)

INTRODUÇÃO

A importância manifesta da utilização dos raios-X, como agente mutacional, levou-nos a efectuar este trabalho. Essa importância, que tentaremos exaltar e explicar no decorrer deste relatório, é tanto maior quanto é certo estar-se já trabalhando afincada e extensivamente em alguns Centros de Melhoramento, tanto da Europa como da América, na produção de variedades mais valiosas para a cultura. E este é, a par do emprego no campo da Medicina, apenas o seu maior valor, porque os raios-X são também uma ferramenta de grande utilidade para a Ciência pura. As contribuições que tem dado à Citologia e à Genética, esclarecendo pontos de dúvida e abrindo caminho a novas ideias, são disso prova bastante.

A primeira conclusão a que, neste campo, os cientistas chegaram, no segundo vinténio deste século, foi a de que os raios-X eram capazes de *produzir mutações*. De então para cá tem-se trabalhado com o objectivo fixo de se obter desse agente o máximo resultado e rendimento. Estamos em crer, mesmo, que num futuro próximo seja possível, não só produzir mutações, mas, inclusivé produzi-las em determinadas direcções. Evidentemente que longe de nós está qualquer ideia dum comando absoluto de hereditariedade; essa direcção seria um condicionamento apenas de algumas características, mas que, incontestàvelmente, poderá ser de extraordinário interesse, conforme se antevê pelos resultados já obtidos.

Quando em 1927 MULLER, trabalhando em *Drosophila melanogaster*, conseguiu demonstrar de forma irrefutável a possibilidade de, por meio dos raios-X, aumentar notàvelmente a frequência de mutações nos seres vivos, novas e extensas perspectivas se abriram nos campos da Citologia e da Genética.

Já anteriormente outros autores — STEIN (1922 e 1926), BAGG e LITTLE (1924), NADSON (1925), NADSON e PHILIPOV (1925) e BAGG, MAC DOWELL e LORD (1925) — tinham ensaiado a acção das radiações, em diferentes materiais vivos, mas os resultados atingidos eram contraditórios e pouco conclusivos.

O trabalho de MULLER foi imediatamente confirmado por PATTERSON (1928, 1929), SEREBROVSKY (1928), TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1928, 1929), WEINSTEIN (1928), HANSON (1928) e essa corroboração estendeu-se a outras espécies por DEMEREC (1929), para a *Drosophila virilis* e TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (cit. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, 1939) para a *Drosophila funebris*, bem como a outros géneros distintos, com a vespa *Habrobracon* (WHITING 1928 e 1929), e ao infusório *Chilodon* (MAC DOUGALL, 1928 e 1929).

No reino vegetal, e, com o mesmo objectivo, foram também iniciadas algumas pesquisas sobre *Datura* (GAGER e BLAKESLEE, 1927), *Avena, Hordeum, Triticum* e *Zea Mays*, (STADLER, 1928 a, b e 1929), *Antirhinum*, STUBBE (1930 a e b) e, *Nicotiana*, GOODSPEED (1929 a e b)

O avultado número de trabalhos publicados posteriormente a 1927 sobre este assunto, mostra bem quanto interesse o cientista encontra no estudo da acção dessa nova ferramenta da ciência biológica — os Raios-X. Bastará dizer, que desde essa data até 1939, isto é, no escasso período de uma dúzia de anos, se utilizaram nas pesquisas de radiogenética 25 espécies animais e 39 vegetais, e que nelas estiveram interessados para cima de 80 investigadores (*).

Até que ponto, então, a Genética se serve ou pode vir a servir dos raios-X?

Para responder a esta pergunta temos que nos colocar em dois campos que, se bem que interferindo-se mùtuamente, apresentam aspectos distintos quanto ao problema; são eles a Ciência pura e a Ciência aplicada, isto é a *Genética teórica*, com os seus estudos sobre a transmissão de caracteres, evolução, e citológicos, e a *Genética prática* na contribuição ao melhoramento. Em ambas o trabalho de MULLER teve extraordinária projecção; apesar disso, enquanto no primeiro, os raios-X foram desde o início, considerados de grande valor por todos os autores, no segundo as opiniões dos inúmeros cientistas divergem, crendo uns serem eles de

(*) Estes números são fornecidos por TIMOFÉEFF-RESSOVSKY no seu trabalho de 1939.

marcado interesse, pensando outros que a radiação não serve ou dá resultados fracos e imprecisos.

É, exactamente, STADLER, que um ano depois da apresentação do trabalho de MULLER, confirma a ideia de que nas plantas se passava o mesmo que na *Drosophila*, que veio mais tarde, em 1930, com cepticismo, duvidar do valor prático dos raios-X no melhoramento dos cereais. Declarava ele que «as variações resultantes de mutações induzidas são na maior parte dos casos desfavoráveis», desapossando assim de valor o emprego de diversos agentes, entre os quais os raios-X. E, logo a seguir, dizia: «e, as raras mutações favoráveis podem ser acompanhadas de mutações desfavoráveis induzidas pelo mesmo tratamento», o que ainda mais viria restringir o interesse da radiação.

Uma coisa porém estava desde o início estabelecida: a mutação induzida surgia sempre numa frequência de ocorrência muito superior à natural, chegando a atingir na *Drosophila* 150 vezes mais (MULLER, 1927). Entretanto, MULLER e outros autores, continuavam estudando afincadamente a acção das radiações esperançados no bom êxito da emprêsa.

Um dos principais pontos que desde o início suscitou maior polémica foi o do valor da radiação natural, como agente indutor das modificações que se observam nos seres vivos, e, que permitem a sua evolução. De facto, uma vez verificada a acção mutacional dos raios-X, e, conhecendo-se a existência de radiações similares na Natureza, essa ideia surgia como consequência, e os raios-X revestiam-se de excepcional importância na revelação dos processos naturais e indução artificial de novos seres ou melhoria dos existentes.

Diversos autores se ocuparam deste assunto, que MULLER apresentou nos seus primeiros trabalhos (1927 e 1928 a): OLSON e LEWIS (1928), BABCOCK e COLLINS (1929 a e b) CETVERIKOV (1929), JOLY e DIXON (1929) e HANSON e HEYS (1930), entre outros, e a conclusão a que chegaram foi a de que a radiação natural é insuficiente para justificar todas as mutações que aparecem expontâneamente. Os cálculos que levaram a estes conhecimentos foram apresentados independentemente por MULLER e MOTT-SMITH (1930), TIMOFÉEFF-RESSOVSKY e EFROIMSON (1931) concluindo o primeiro autor que a radiação cósmica é 1.300 vezes menos intensa do que a necessária para explicar a frequência de mutações naturais. Os cálculos dos outros

dois autores levaram a valores mais pequenos, mas, ainda assim, suficientes para demonstrarem a impossibilidade de se atribuir a frequência das mutações expontâneas, às radiações naturais.

Em 1939, JOLLOS, pretende trazer novamente o tema à discussão. As suas experiências incidem sobre culturas de *Drosophila melanogaster* que submete à acção daquelas radiações, em dois laboratórios que diferiam em altitude de 4.200 metros aproximadamente. Já de há muito se sabia que o valor da radiação cósmica crescia com a altitude. Os trabalhos de HESS e KOLHÖSTER (1913), (cit. LEPRINCE-RINGUET, 1943) tinham mesmo levado à conclusão de que a 9.000 metros as descargas produzidas pelos raios cósmicos eram *12 vezes* maiores do que ao nível do mar. Sendo assim, as culturas de *Drosophila* ficavam sujeitas a acções distintas e, deveriam revelar, por consequência, efeitos diferentes. Foi o que JOLLOS poude verificar: as culturas postas a maior altitude mostraram um grau de mutabilidade 3 vezes maior do que as situadas no ponto mais baixo. Empregando ainda, no seu trabalho placas de chumbo, JOLLOS verificou que as culturas do laboratório colocado a maior altitude e dispostas sob essas placas apresentavam uma mutabilidade 15,5 vezes maior do que a das culturas no ponto inferior e sem acção do chumbo.

Estes trabalhos não foram continuados e, por conseguinte, as dúvidas que os seus resultados levantam não puderam de modo algum ser esclarecidas. No entanto, a ideia da acção aumentativa, por parte do chumbo, dos efeitos das radiações não se perdeu, e, é MEDVEDEV, quem, em 1933, a toma novamente em consideração, se bem que, com um objectivo diferente, conforme, referiremos.

A radioactividade natural continuou a merecer a pouca atenção para que a tinham lançado MULLER e MOTT-SMITH e outros. Porém, se atendermos a que: a) esses autores utilizaram nos seus cálculos valores médios e se basearam na suposição duma proporcionalidade directa entre a quantidade de radiação e percentagem de mutações, que pode não estar rigorosamente exacta; b) a intensidade da radiação varia com a latitude e altitude; e, c) as plantas podem concentrar material radioactivo nos seus tecidos, conforme o provou VERNADSKY (1929-1930), a rádio-actividade natural surge-nos com uma influência possìvelmente muito maior do que a que até aqui se lhe vem atribuindo.

Devemos, neste momento, referir que as causas da mutação

expontânea (note-se que a designação «mutação expontânea» é apenas, como diz DOBZANSKY (1947), «uma admissão hàbilmente disfarçada da ignorância do fenómeno»), têm sido também atribuidas a outros factores naturais, como a temperatura e a luz, destacando-se nesta, as radiações ultra-violetas.

Contudo, a temperatura, que MULLER (1928 b) TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1935), GOLDSCHMIDT (1929) e JOLLOS (1931) pretendem ser, senão o único, pelo menos o principal agente mutacional, é considerado de menos valor por ROKIZKY (1930), PLOUGH e IVES (1935), LAUROW (1935), BUCHMAN e TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1935) e outros, que concluem, que embora os choques térmicos aumentem a mutabilidade dos seres vivos, o acréscimo observado não é suficientemente elevado para justificar as mutações que se verificam. Mesmo a exposição a baixas temperaturas parece originar igual grau de mutabilidade que os choques térmicos (GOTTSCHEWSKY, 1934; BIRKINA, 1938; e KERKIS, 1939). Estas contradições fazem relegar para um plano inferior, enquanto uma demonstração completa não vier demonstrar o inverso, a acção única e exclusiva da temperatura. DOBZHANSKY (1947), estudando o problema da mutação expontânea, atribui fraco valor tanto a esse agente como à luz, e exalta a acção das substâncias químicas. Diz esse autor: «é muito provável, que a mutabilidade possa ser influenciada, *se não causada* (*) por agentes químicos», e, mais adiante: «é difícil conceber que outros que não sejam os mecanismos químicos provoquem a modificação da mutabilidade dos genes por acção doutros genes...» e, apresenta uma grande lista de trabalhos de autores que utilizaram as mais diversas substâncias químicas quere orgânicas, quere inorgânicas, com o objectivo, fracassado nuns casos, com êxito, noutros, de indução de mutações.

Poderemos, assim, considerar como elementos de primacial importância na mutação natural dos seres vivos a radio-actividade, quere cósmica quere produzida pelas substâncias radio-activas, a temperatura, a luz e os diversos componentes químicos do solo, e, mesmo do ar. Ainda podemos focar um agente biológico, o caso dos virus, COUTINHO (1942), que parece poder induzir mutações. A todos estes, certamente haverá que acrescentar outros, mas de

(*) O itálico é nosso, pretendendo realçar a ideia fundamental do autor.

muito menor importância, e, a ordem porque são expostos, podendo ser a de valores decrescentes, não quere dizer forçosamente que o seja. É mesmo provável que a temperatura deva figurar em primeiro lugar. E mais, essa ordenação terá menos significado se pensarmos que na maioria dos casos esses agentes não actuam isoladamente, mas sim, em acção acumulada e simultânea.

Dentro deste aspecto de acções conjuntas e, para o caso que mais nos interessa, o dos raios-X e outros agentes, muito se tem ensaiado e alguns resultados se têm obtido. É claro que, embora as radiações tenham já provado ser, mesmo actuando isoladas, ferramenta utilizável pràticamente, (GUSTAFSSON, 1947) conforme teremos ocasião de ver, nem por isso se deverá deixar de procurar aumentar-lhe a eficiência, empregando os mais variados meios e modificando os métodos de actuação. Subordina estes trabalhos a esperança da obtenção de muito melhores e mais extensos resultados, pois segundo se supõe, e, tudo leva a crer que assim seja de facto, muitas variações de resistência resultam de rearranjos cromosómicos, e, estes obtêm-se com frequência por meio dos raios-X.

Altas e baixas temperaturas, radiações infra-vermelhas e ultra-violetas, substâncias químicas e agentes físicos, como a centrifugação, têm sido os mais utilizados dentro deste campo de investigações — o da acção simultânea com os raios-X.

A influência da temperatura foi estudada por muitos autores entre os quais se contam TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1931 b) MEDVEDEV (1935), SAX e ENZMANN (1939), MULLER (1940) e MAKHIJANI (1944). As conclusões a que chegam são as expressas, em resumo, por MULLER o qual acreditando que as temperaturas excessivamente baixas possam aumentar um pouco, mas muito pouco, a percentagem de mutações, afirma que a influência da temperatura não é de considerar na modificação dos efeitos dos raios-X. Eis por conseguinte um agente que parece não servir os fins em vista e do qual a nossa atenção se vê forçada a desviar.

Outros trabalhos ocupam-se da acção conjunta dos raios-X e radiações ultra-violetas e infra-vermelhas. Entre eles, e, certamente como os de maior vulto, encontram-se os de KAUFMAN e seus colaboradores (1946 a, b e c), que chegam à conclusão de que os raios infra-vermelhos aplicados antes da irradiação aumentam significantemente a frequência dos rearranjos induzidos, enquanto

que os raios ultra-violetas, empregados após as radiações, provocam uma diminuição daquela frequência.

Os raios infra-vermelhos parecem ser úteis para o objectivo que se pretende, no entanto, o facto daqueles trabalhos serem muito recentes e sem a necessária confirmação, não permite ainda exaltar com seguranca esse agente.

Deixando para o fim os agentes químicos, aos quais dedicaremos particular atenção, já porque provaram ser os colaboradores mais eficientes das radiações, já porque a eles dedicaremos um capítulo especial do nosso trabalho, faremos a seguir uma breve alusão ao agente físico empregado — a centrifugação.

Temos conhecimento dum único trabalho que tenha utilizado a centrifugação, conjuntamente com os raios-X, o de SAX (1943). Verifica este autor, que centrifugando, durante e após a irradiação, microsporos de *Tradescantia*, se produz um aumento da percentagem de aberrações cromosómicas, e, em especial, da fragmentação. Este efeito é compreensível — e o próprio SAX aponta o facto — porque a centrifugação obrigando os fragmentos a movimentarem-se na célula, e, por consequência, afastando as superfícies de rutura, dificultará ou impedirá mesmo a posterior reunião. Se bem que este agente não esteja ainda estudado, ao ponto de esclarecer todo o alcance da sua acção, não deverá ser de muita valia pois provoca normalmente perturbações que levam as células à morte.

Enquanto se verificava o pequeno interesse dos agentes físicos ou físico-químicos a que nos referimos, diversos autores enveredavam por outro caminho, e, procuravam, na química, os elementos susceptíveis de coadjuvar, de forma satisfatória, a acção das radiações. O emprego deste meio parecia de facto, desde logo votado ao êxito. As diferentes substâncias, actuando sobre o cromosoma, certamente poderiam introduzir modificações de ordem química, e, alterar assim, as condições de resistência aos raios-X. Mais ainda, e, daí o seu interêsse muito especial, a grande diversidade de substâncias que se poderiam utilizar, aliada à complexidade de composição dos cromosomas, permitiria talvez uma certa orientação de resultados, pois cada agente deveria actuar de modo diferente ao longo do filamento cromosómico.

O primeiro trabalho que neste campo surgiu, foi o de STADLER (1928 b), que ensaiou a acção modificadora de diversos sais de metais pesados. Dado o seu peso molecular elevado e a marcada

intervenção no fenómeno da irradiação, a preferência que lhes dava justificava-se perfeitamente. Os resultados que alcançou vão expressos no quadro seguinte que extraímos do seu trabalho:

QUADRO I

TRATAMENTOS		N.º de cult. analisadas	N.º de mutações induzidas
Irradiação	Agentes químicos		
raios-X	Ba $(NO_3)_2$	136	9
	Pb $(NO_3)_2$	133	9
	$UO_2(NO_3)_2$	194	11
	s/ tratamento	72	2
testemunha s/raios-X	$UO_2(NO_3)_2$	53	0
	s/ tratamento	76	0

Por ele, se observa, que a impregnação de sais de metais pesados não provoca só por si qualquer mutação, mas que associada à aplicação, posterior, da radiação, aumenta de forma notável a percentagem de mutações.

Igualmente, MEDVEDEV (1933), autor russo que também se dedicou ao estudo da acção dos raios-X, mas em Drosophila, deduziu, dos seus trabalhos, que a impregnação de sais de metais pesados provoca um aumento do poder mutativo dos raios-X. O agente químico empregado foi o acetato de chumbo, $Pb(CH_3COO)_2$, mas o autor não verificou a acção desse agente isoladamente. Os resultados que obteve resumem-se no seguinte quadro:

QUADRO II

Tratamentos	N.º de culturas da F_2	N.º de mutações	%
Raios-X	1792	93	5,38
Alimento com 1 % de $Pb(CH_3COO)_2$ + Raios-X. . .	1617	119	7,36
Injecção de $Pb(CH_3COO)_2$ . . .	138	18	13,04

Resulta pois, que tanto para as plantas como para os animais, os sais de metais pesados parecem reforçar a acção dos Raios-X, como agente mutacional, talvez como aqueles autores pretendem, em virtude da emissão duma radiação secundária.

Além dessas substâncias, outras têm sido empregadas com o mesmo objectivo.

BRUMFIELD (1943) observou que o tratamento prévio com colchicina fazia diminuir para 1/3 a percentagem de aberrações cromosómicas induzidas pelos Raios-X.

MARSHAK (1938) utilizou a amónia e como conclusão, aliás rebatida por LEA (1946), verificou também um abaixamento do valor da percentagem de aberrações cromosómicas.

Ultimamente, na Suécia, está-se empregando já, com objectivo prático, a irradiação de sementes, prèviamente tratadas por diferentes substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas. Deste trabalho conhecemos uma publicação de D'AMATO e GUSTAFSSON (1948) em que os autores empregaram em diferentes graus de solução alguns produtos químicos: colquicina, cianeto de potássio, anidrido carbónico, nitrato de urânio, sulfato de ferro, e, também a água destilada. Igualmente ensaiaram pré-tratamentos com diversas concentrações hidrogeniónicas, com o objectivo de observar o efeito do pH. As conclusões a que chegam, se bem que não devam mostrar ainda totalmente a extensão dos trabalhos em curso, são suficientemente elucidativas do êxito obtido.

* * *

O conhecimento do processo de actuação dos raios-X, vem de há muito preocupando o espírito dos investigadores. Mas, apesar da grande quantidade de trabalhos que se tem efectuado, os resultados são, sob esse ponto de vista, pouco ou nada concludentes. Consegue-se, é certo, empregar esse agente com êxito, mas o seu modo íntimo, digamos assim, de actuar, mantem-se obscuro. No dia em que for descoberto muito se avançará porque então esse êxito terá aumentado um cem número de vezes.

Os diversos autores dividem-se em dois campos: os que pensam que as mutações génicas e as variações cromosómicas são induzidas por uma acção directa dos raios-X, ionizando moléculas pertencentes ao cromosoma, e, mesmo ao gene, e os que aceitam a ideia de uma acção mais indirecta, não admitindo a hipótese de

simples ionização ou mesmo de uma série de ionizações. Pertencem ao primeiro grupo GRÜNEBERG (1931), JORDAN (1938), TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1939), LEA e CATCHESIDE (1942), LEA (1946), DOBZHANSKY (1947), etc.; e, ao segundo, FRICKE e DEMEREC (1937), MULLER (1940), DARLINGTON (1947), entre outros.

A acção indirecta produzir-se-ia por uma modificação química do meio que envolve o cromosoma ou o gene. Esta modificação é susceptível de se dar sob a acção dos raios-X. Estes, de facto, pela ionização que provocam em qualquer substância levam-na a um estado molecular instável, que tende, depois, naturalmente, para o equilíbrio, com uma recombinação que pode originar novas moléculas, diferentes das anteriores. Citamos, como exemplo, o caso da decomposição da parafina em hidrocarbonetos voláteis e dióxido de carbono.

Se atendermos a que a acção de modificação química das radiações é tanto mais facilitada quanto mais complexa forem as moléculas sujeitas ao tratamento, — caso das substâncias que constituem os cromosomas, — a aceitação de que as mutações e variações cromosómicas são motivadas por uma acção indirecta, toma vulto e parece justificar-se. Porém TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1930) e GRÜNEBERG (1931) conseguiram demonstrar, em apoio das conclusões teóricas de MULLER, que não existe uma acção retardada, dos raios-X, isto é, que o citoplasma irradiado não induz qualquer mutação em cromosomas que nele passem a figurar. Ainda MAVOR (1929), KERKIS (1935) e outros concluiram dos seus trabalhos, que tecidos somáticos irradiados não têm qualquer inferência em mutações das células germinais.

Experimentalmente, pois, verifica-se que a acção indirecta dos raios-X não tem o valor que teòricamente se lhe poderia atribuir; contudo, alguns autores continuam a pensar que essa acção é bastante importante. A questão mantem-se ainda em estado de dúvida. É provável que os dois mecanismos — acção química e acção directa — se desenvolvam simultaneamente; mas, desde já se pode dizer que, principalmente para o caso das variações cromosómicas, deve ter maior importância a segunda hipótese.

As ruturas dos cromosomas, provocadas pelos raios-X, parecem resultar da dissipação de energia no ponto de fractura, por ionização ou excitação. Diz LEA e CATCHESIDE (1942) que: «num ponto onde se produz ionização produz-se necessàriamente uma

rutura» isto, evidentemente, desde que esse ponto esteja localizado no cromosoma. Basta uma partícula ionizante para provocar uma fragmentação, mas, parece que há um mínimo de ionizações, isto é, de electrões libertados, para que ela se dê (LEA e CATHESIDE, 1942). Esse número, dizem estes autores ser igual a 17. SAX (1940) diz que sob certas condições uma única ionização ou uma cadeia de ionizações «closely spaced» podem ser responsáveis por mais de uma fractura.

O problema da mecânica do rompimento dos cromosomas anda intimamente ligado com o do local onde se verifica. A existência de pontos de rutura tem sido um tema debatido desde 1931, data em que LEWITSKY e ARARATIAN afirmaram haver uma zona junto ao centrómero como sendo a mais sujeita a ruturas. CÂMARA (1935, 1936 e 1941), utilizando como materiais de estudo o *Triticum monococcum* L. e o *Aloë arborescens* L., demonstra que não existe apenas uma dessas zonas, mas que cada cromosoma apresenta determinados *pontos críticos* de rutura. Esta ideia é partilhada por LEWITSKY e SIZOVA (1935), e SAX, (1938), e, apoiada pelas experiências, de ordem genética, de GOWEN e GAY (1933) e PATTERSON, STONE, BEDICHEN e SUCH (1934).

Entretanto, outros autores, como BAUER, DEMEREC e KAUFMANN (1938) e BAUER (1939) contrariam essa opinião, e, afirmam que as ruturas, se distribuem na *Drosophila melanogaster*, ao acaso, isto é, proporcionalmente ao comportamento dos cromosomas, mas que, no entanto, parece haver excepção para as regiões heterocromáticas. Esta nova ideia é aceite pela maioria dos investigadores e essas regiões ficam sendo as principais responsáveis pelas ruturas. O problema aprofunda-se, e, MULLER e os seus colaboradores (1935, 1937 e 1945) observam a existência, dentro das zonas heterocromáticas, de pontos onde as fragmentações ocorrem, de preferência.

Estamos em crer que a hipótese de SERRA (1944) sobre a estrutura do cromosoma poderia explicar perfeitamente todos os resultados até aqui obtidos. Na realidade as *zonas de contacto*, por ele admitidas, e que separam quere cromómeros, quere genes, quere ainda, dentro destes, as *zonas activas*, são regiões que podiam perfeitamente ser consideradas como mais susceptíveis à rutura, por acção da radiação.

Contudo a questão pode assumir outros aspectos. SAX e MATHER (1939) demonstraram a maior tendência à rutura junto do centró-

mero do que noutro qualquer ponto; e ainda SAX (1942) verifica que a inexistência do centrómero reduz o número de fragmentos. Tudo parece indicar que o centrómero desempenha um papel importante na definição das zonas ou pontos de rutura. Assim, CÂMARA, WAGNER e GARDÉ (1948) em tese a apresentar ao VIII Congresso de Genética, que se realizará em Estocolmo, concluem que os pontos particularmente vulneráveis à acção dos Raios-X, devem ser consequência duma actividade química perto do centrómero, e não, duma susceptibilidade especial do cromonemata naquelas regiões; e isto, depois de comprovarem, mais uma vez, que as ruturas se dão de preferência junto do centrómero, e, que os fragmentos acêntricos são menos vezes ruturados que aqueles providos de centrómero.

O problema do modo como as radiações actuam mantem-se, como vemos, bastante obscuro, nos seus pontos capitais. No entanto já muito se esclareceu, principalmente, no que respeita à influência das diferentes características dos raios-X. Focaremos este ponto apenas de passagem, por ser de longa e complexa exposição, e por isso, fora do âmbito deste trabalho, e dos nossos conhecimentos, pois nos levaria para assuntos de física e física-química.

A percentagem de mutações e de aberrações cromosómicas é proporcional à dose de raios-X aplicados (unidades roentgen). Opostamente consegue-se no entanto demonstrar a sua independência da intensidade, da duração e da continuidade do tratamento.

A respeito da acção do comprimento de onda as opiniões divergem; contudo, entre determinados limites, ela parece não ter influência na frequência de mutações. As radiações mais activas são as chamadas radiações duras de comprimento de onda compreendido entre 120 e 250 Kw, e cuja intensidade iónica anda à volta dos 6 miliamperes.

Observados os principais problemas relacionados com os raios-X, nos campos da mecânica da sua actuação, lembraremos, em rápida revisão, as contribuições que eles têm dado para a Citologia, Genética e Melhoramento.

Ser-nos-ia impossível citar todos os campos da sua aplicação, tantos e tão extensos eles são; e, mais difícil seria ainda, se preten-

dessemos prever todos aqueles que poderão vir a desempenhar papel importante nos três referidos ramos da Biologia.

As radiações, dentro do campo teórico, têm sido utilizadas com os mais variados fins e nas mais diversas direcções, desde o estudo do estranho e discutido gene à distrinça da complexa mecânica cromosómica. Assim o emprego dos raios-X tem permitido: (a) definir a localização dos genes ao longo dos cromosomas, (b) elaborar os respectivos mapas e (c) demonstrar a teoria linear dos genes; e, por outro lado, (d) tentar determinar o volume dos genes, e as distâncias que os separam. Por meio deles, foi também possível demonstrar o efeito de posição, e, comprovar, de forma irrefutável, a teoria do «crossing-over».

Todos estes temas tratados com mais ou menos profundidade e aceites em maior ou menor extensão, têm sido objecto de inúmeros trabalhos, que seria impossível citar aqui. Para cada um deles teríamos que inscrever uma longa lista de obras e autores, e, a ideia de apresentarmos a mais leve discussão sobre eles, levar-nos-ia para a elaboração dum enorme volume.

Mas, os raios-X não permitiram sòmente o aceleramento da construção da teoria cromosómica; a sua acção manifestou-se também noutros campos.

As análises genéticas das diferentes espécies animais e vegetais, andam intimamente ligadas às modificações hereditárias que sofrem. Sendo assim, todo o apressar dos processos mutativos, por meios artificiais, melhor dizendo experimentais, — e os raios-X são um elemento que o consegue, — reveste-se de excepcional valor por permitir não só a repetição de fenómenos naturais, como também por poder originar novas modificações, até então, desconhecidas, e, quem sabe se até uma antecipação à Natureza. Se aceitarmos que um número muito elevado das mutações naturais se tem perdido, por terem surgido em ambientes desfavoráveis à sua fixação e expansão, então deveremos realçar em especial, o valor da repetição da mutação, por permitir o reaparecimento dessas características, em meios propícios ao seu desenvolvimento, e, assim, o seu aproveitamento. Este é um aspecto que mostra bem quanto os raios-X podem servir o Melhoramento.

Um outro campo em que o seu emprego se reveste de excepcional interesse é o da arboricultura. Aqui a possibilidade de se

poder recorrer à multiplicação vegetativa vem auxiliar grandemente essa ferramenta do melhoramento que são os raios-X. Realmente com tal ajuda fácil se torna propagar uma mutação somática de gomo, que as radiações induzam, e assim obter novas variedades, com novas características. Pouco se tem ensaiado neste sentido, mas, deve-se principalmente às dificuldades, técnicas e práticas, de tratamento, porque o caminho se mostra como o mais indicado e com um êxito, parece-nos que bastante assegurado.

Em todos os centros de Melhoramento se tem ensaiado a acção das radiações e, embora nem sempre os resultados tivessem sido coroados de êxito, é certo que se conseguiram obter já linhas culturais melhores, quere pelo aumento de resistência às doenças, quere pelo acréscimo da produção.

Os primeiros autores que assinalaram o êxito, de ordem agronómica, do emprego dos raios-X foram DELAUNAY (1934) e SAPEHIN (1934). Trabalhando com trigos, conseguiram obter mutantes férteis, e, de maior valor do que o das formas que lhe deram origem. Estes trabalhos foram objecto de réplica de alguns cientistas, por serem apresentados por forma incompleta e duvidosa. «No crop figures have been published» diz GUSTAFSSON (1947) e, por outro lado, não se faz neles alusão aos indispensáveis ensaios testemunhas. Qualquer que tenha sido o sucesso real destes trabalhos eles mantiveram-se sempre mais ou menos incompletos e ocultos, e, não nos permitem apoiar neles as nossas considerações.

Os resultados alcançados pelos diversos autores americanos não foram muito notáveis. GOODSPEED (1929), LINDSTROM (1933), MAC ARTHUR (1934), GENTER e BROWN (1941), entre outros, obtiveram conclusões francamente negativas, sob o ponto de vista agrícola. Trabalhos mais recentes, que sabemos estarem em curso, parecem ter sido mais bem sucedidos, mas sobre eles nada se publicou de definitivo.

Em 1942, GUSTAFSSON, consegue tratando com elevadas doses de radiação, grãos de cevada ainda por germinar, induzir interessantes e férteis mutações destacando-se delas duas formas de cevada de outono, três mutantes com espigas de seis ordens e muitas formas de tipo *erectum*.

De mais franca utilidade é a linha de cevada resistente ao míldio que FREISLEBEN e LEIN (1943a) conseguiram produzir por aplicação de radiações.

Chegou-se assim ao campo utilitário e só faltava passar à produção em massa de mutantes de interesse agrícola.

GUSTAFSSON, e a grande falange dos seus colaboradores têm sido os investigadores que maiores resultados alcançaram até agora. No seu trabalho de 1947, passa em revisão o problema, e apresenta as primeiras conclusões duma série de estudos que há anos vem executando. Este autor diz ter obtido dois mutantes de cevada (44/7 e 44/23 segundo a sua nomenclatura) com considerável aumento de tamanho do grão, e, mesmo no 44/23, com maior número de grãos, correspondendo a um acréscimo de produção de 9 %. Outro êxito alcançado no mesmo material, isto é, na cevada, foi o acréscimo da capacidade de produção de malte, especialmente em poder diastásico e dextrinizante.

Continuando a descrição dos seus trabalhos cita a obtenção de uma variedade de nabo com 39,3% de gorduras nas sementes, a partir de plantas sòmente com 38,6 %, e, declara ter alcançado alguns bons resultados em mostarda e tremoço doce. A melhor técnica que encontrou foi a de aplicação dos raios-X sobre sementes imersas durante 24 horas, e o material que mais favorável se mostrou foi a cevada. Aconselha para os cereais comuns a aplicação de dosagens de 10.000 a 20.000 r.. Chega a outras conclusões interessantes que convem focar pois são de imediato interesse: a) um longo armazenamento produz uma intensificação substancial dos efeitos das radiações; b) à maior dimensão da semente corresponde de facto, como MUNTZING (1941) afirmava, uma maior resistência ao agente actuante, e, assim, os autotetraploides podem ser mais resistentes do que dos diploides pois possuem normalmente sementes de maiores dimensões; c) a resistência aos raios-X varia com as espécies havendo umas como as crucíferas que chegam a resistir a doses de 100.000 u. r., e, outras, cuja dosagem máxima não pode ir além de 10.000 a 20.000 u. r., como as ervilhas, girassol, cânhamo, etc.. Nem mesmo as doses muito elevadas serão sempre as mais aconselháveis. FRÖIER, GELIN e GUSTAFSSON (1941) demonstram que o número de perturbações induzidas por fracas dosagens é directamente proporcional ao número de genómios. E assim, para 5.000 r. a quantidade de alterações apresentou-se nas seguintes percentagens:

T. monococcum	11 %
T. durum e *T. dicoccum*	22 %
T. vulgare	29 %

e, para um tratamento de 25.000 r.:

T. durum	99 %
T. vulgare	96 %

Se pois uma dosagem mais forte produz mais elevados efeitos nem sempre convirá adoptá-la pois, proporcionalmente, doses mais fracas darão origem a maiores resultados, e, não podemos perder de vista o aspecto económico do tratamento, que permita a produção, em grande extensão, de mutantes.

Não se atingiu ainda este último desiderato, no entanto, as investigações prosseguem tentando desvendar mais e mais o problema e, a pouco e pouco, vão surgindo novos e cada vez mais valiosos resultados, e vai aumentando a esperança da obtenção de muitos mais.

Sabemos estarem actualmente na forja inúmeros trabalhos que utilizam as radiações. Em todos os centros de investigação palpita a ânsia de encontrar o melhor caminho, novas fórmulas que permitam uma realização fácil, e prática, do que se pretende — a obtenção de mutações de valor económico.

Deixámos para o fim o relato dos trabalhos que sobre o *Triticum* se têm realizado. Fizemo-lo propositadamente pois trata-se do género sobre o qual incidirá o nosso trabalho. Sendo o trigo uma planta de interesse capital para o homem, em todo o mundo, tem por isso mesmo, sido um dos alvos mais atingidos pela investigação.

Citamos, entre outros, por serem os mais extensos ou profundos, e, serem aumentados no sentido que estamos focando, isto é, o da produção de mutantes de valor agrícola, os trabalhos de STADLER (1929), CÂMARA (1935, 1936) SMITH (1936, 1939) para os trigos diploides, SAPEHIN (1935) para os tetraploides, e DELAUNAY (1930, 1931, 1932 e 1934), SAPEHIN (1930, 1934 e 1936) FONDARD et CABASSON (1939), RANJAN (1940), GUSTAFSSON (1941 a 1947) para os trigos de $2n = 42$ cromosomas.

Os mutantes vitais, morfológicos ou fisiológicos, obtidos até agora, apresentam-se de fraco interesse imediato, mas, a despeito

destes resultados insuficientes, GUSTAFSSON (1947), afirma, como conclusão, num dos seus trabalhos que: «...it is clear that the wheat breeder can produce vital mutants of practical value by means of X-ray treatment».

* * *

Esta frase de GUSTAFSSON, generalizada a todas as plantas que interessam ao melhorador, representa bem a ideia com que ficámos depois da revisão do problema da aplicação dos raios-X.

Foi a importância dessa aplicação que nos levou a efectuar este trabalho.

A escolha do material para o nosso estudo incidiu sobre o trigo. Na realidade, de todas as plantas anteriormente estudadas, é ele sem dúvida uma das que mais tem sido trabalhada pelo seu interesse económico mundial. Estava pois indicado o seu emprego; e, como de há bastante tempo, neste laboratório se vem estudando o *Triticum monococcum* que por conseguinte é já conhecido e para o qual as técnicas estão aperfeiçoadas, e, ainda por ser uma planta com baixo número de cromosomas ($2n = 14$), facilitando assim a observação das variações cromosómicas induzidas, foi a espécie escolhida.

As dificuldades que encontrámos foram grandes, no que respeita à irradiação. Tivemos que nos socorrer da boa vontade e auxílio de diferentes entidades possuidoras de aparelhos de raios-X com as desvantagens, para o trabalho, de desaproveitamento de tempo, devido a uma subordinação a horários diferentes dos que mais conviria adoptar, e, sujeitando-nos por vezes à perda de material, pelo afastamento dos diversos locais de trabalho e desafinação consequente das técnicas. Procedemos sempre de modo a que os resultados não pudessem ser afectados por qualquer deficiência técnica, na medida evidentemente da previsão que pudémos ter.

Igualmente, suscitados pelo interesse que apresenta a simultaneidade da acção de agentes químicos e dos raios-X, interesse que tivemos ocasião de apreciar, apresentaremos os resultados obtidos com um ensaio em que se empregou o sal de um metal pesado — o acetato de chumbo.

MATERIAL E MÉTODOS

Como já referimos, a escolha do material para o nosso trabalho recaiu sobre o *Triticum monococcum* L..

As sementes que utilizámos foram-nos cedidas pelo Departamento de Melhoramento de Cereais da Estação Agronómica Nacional, e, fazem parte da sua linha de cultura n.° 3.580.

Após germinação, em água destilada, para evitar a acção possível de quaisquer sais que pudesse conter, a irradiação das sementes teve lugar logo que as radículas começaram a despontar, dado que nesse estado encontrariamos um maior número de células em actividade mitótica.

A dose aplicada foi de 5.000 r., com as seguintes características: 10 mA, 180 Kw, 0,3 mm. de alumínio, à distância de 30 cm., e, durante 25 minutos.

Efectuámos as fixações do material em Medium Fleming durante os oito dias que se seguiram aos tratamentos, empregando-se a técnica de KAGAWA para contrair os cromosomas, e, o Quetschmethod de HEITZ para a coloração. As lâminas foram preparadas pelo método de esfregaço.

As lâminas assim obtidas podem, evidentemente, conter, por vezes, ruturas de células e mesmo de cromosomas, devido à pressão a que são submetidas. Este facto é de considerar se atendermos a que um dos efeitos dos raios-X é precisamente a rutura dos cromosomas. Por isso, tivemos sempre o cuidado, ao percorrer ao microscópio, as lâminas, de só tomarmos em consideração células inteiras e em que não pudesse prevalecer qualquer vestígio da acção do esfregaço, que fosse susceptível duma interpretação errada. Claro que, por vezes, atendemos a células com a membrana e o citoplasma destruidos, e, até mesmo a cromosomas soltos — nos casos das translocações — mas, sempre com as necessárias reservas.

Este material foi também utilizado como testemunha no ensaio com acetato de chumbo, uma vez que a irradiação se fez ao mesmo tempo.

Nesse ensaio a germinação teve lugar em placas de Petri, com papel de filtro embebido em soluções de diferentes concentrações do referido sal: 0,10 °/₀, 0,25 °/₀, 0,50 °/₀, 0,75 °/₀, 1 °/₀, 2 °/₀ e, 10 °/₀. Antes da irradiação os grãos eram tirados da placa que continha

o acetato de chumbo, passados para a mesma placa das testemunhas, para que ambos sofressem a irradiação ao mesmo tempo e não houvesse possibilidade de erro. O trigo foi submetido à acção do acetato de chumbo sòmente antes do tratamento pelos raios-X e nunca depois da irradiação. Pretendia-se, assim, fazer variar a susceptibilidade dos cromosomas a esse agente.

A preparação das lâminas fez-se por processo idêntico ao há pouco indicado.

Para desenhar empregou-se uma câmara clara Zeiss aplicada a um microscópio Seibert, e, utilizou-se uma objectiva de imersão de 100 e oculares de 15, correspondendo a uma ampliação de 1580 diâmetros.

RESULTADOS DA OBSERVAÇÃO E DISCUSSÃO GERAL

I Parte — *Acção modificadora dos efeitos dos raios-X por meio do acetato de chumbo.*

Antes de efectuarmos o estudo da acção conjunta do acetato de chumbo e dos raios-X, tornou-se necessária uma breve análise desse primeiro agente actuando isoladamente, não só para determinar a concentração mais favorável para o estudo que pretendiamos, mas também para avaliarmos os efeitos dessa substância química, a fim de não sermos induzidos em erro na interpretação final dos resultados. Atribuindo-se ao acetato de chumbo a capacidade de provocar ruturas nos cromosomas, os resultados, após a irradiação, poderiam levar à conclusão de que os raios-X tinham assim encontrado um colaborador que lhe aumentava os efeitos, quando na realidade apenas havia uma sobreposição dos mesmos. A conclusão estava assim fundamentalmente errada. Essa análise podia dar-nos, por outro lado, elementos que explicassem a sua acção.

Com este objectivo, submetemos os trigos à acção de solutos aquosos de acetato de chumbo com as concentrações de 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % e 10 %. Os resultados observados resumem-se no quadro III, que nos dá uma indicação geral da forma como esse agente actua.

Ensaiámos, posteriormente, soluções de 0,25 % e de 0,75 % com o objectivo de determinarmos a concentração óptima de es-

tímulo do crescimento. Os ensaios, se bem que de pouca confiança por perda acidental de material, pareceram contudo mostrar que

QUADRO III

Concentrações	Efeitos gerais
0,1 %	sem efeito visível
0,5 %	estímulo de crescimento
1,0 %	sem efeito visível; raros casos de aglutinação
2,0 %	perturbações grandes, crescimento retardado
10,0 %	perturbações profundíssimas; morte

essa concentração estaria localizada entre os dois valores de 0,25 % e 0,75 % devendo ser, por isso, 0,5 % o valor optimo.

Fig. 1

Um dos aspectos que observámos nas células das radículas submetidas à acção da solução de 0,5 % e, por conseguinte, sujeitas a estímulo de crescimento, é o apresentado na fig. 1, — a colocação do eixo dos fusos segundo uma das diagonais da célula, originando posteriormente, células trianguladas. Pensamos que o fenómeno se deva explicar por aquele estímulo acelerar o ritmo

da divisão não dando tempo a um crescimento suficiente das células, que se achatam longitudinalmente, obrigando o fuso a colocar-se segundo a maior dimensão — a diagonal — para tornar possível a mecânica da anafase.

A concentração de 2 % mostrou-nos diversos e interessantes aspectos de perturbações da substância matriz. Externamente,

Fig. 2

Fig. 3

apenas se verificou um retardamento do crescimento, sem se notar deformidade alguma nas radículas.

Nunca nos pareceu, e, este aspecto é importante para o trabalho em causa, como nas linhas anteriores frizámos, que de modo

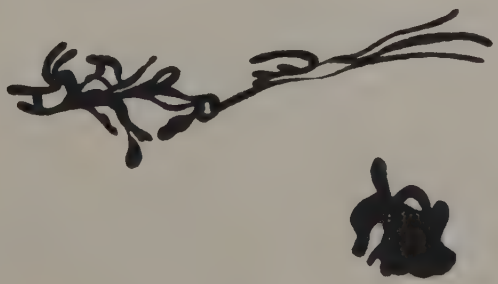


Fig. 4

algum o acetato de chumbo actuasse directamente sobre o cromonema, para a produção de variações estruturais; não observámos, geralmente, o aparecimento de fragmentos ou quaisquer translocações. Não é, no entanto, impossível admitir a possibilidade de ruturas, uma vez que as aglutinações são frequentes e que, consequentemente, se podem vir a formar pontes anafásicas que chegámos a encontrar.

Desde simples filamentos ligando os cromosomas, a aglutinações

totais do complexo cromosómico, todos os estados se observaram (figs. 2, 3 e 4). A solubilização total ou parcial da substância matriz vê-se também, por vezes. Encontram-se cromonemata despidos por completo de calima, sob a forma de compridos filamentos, sem espiralização portanto, e, num caso, foi-nos possível distinguir, nitidamente cromómeros, se bem que não ao longo de todo o cromosoma.

A solução a 10 % produz efeitos mortais. As radículas apresentam-se com um crescimento diminutíssimo, deformadas e perdendo dentro de poucos dias a vitalidade. A observação citológica mostra-nos muito poucas células em actividade, e, essas, profundamente alteradas por aglutinações totais.

Não queremos também aqui deixar de focar a ausência de casos de c-mitose provocados pelo sal empregado, pois LEVAN (1945) cita o aparecimento de c-mitoses, em raíses de *Allium* submetidas à acção de diversos sais de metais pesados, e, exactamente o chumbo um dos acetatos que utiliza e para o qual observa casos perfeitos «que nos detalhes morfológicos são indistinguíveis das típicas mitoses induzidas pela colchicina». Esta dissemelhança de resultados deve-se certamente às diferenças de concentrações utilizadas.

Este ensaio preliminar indicou-nos, portanto, a concentração de 1 % como a mais aceitável para a aplicação simultânea de acetato de chumbo e de raios-X. Os fracos efeitos provocados por essa solução eram medida de precaução suficiente para evitar erros posteriores de interpretação.

Ao passarmos o material pelo microscópio tivemos em mente observar o maior número possível de lâminas para termos assim resultados tirados de mais elevado número de raízes. Não pudémos, por isso, percorrer cada lâmina de por si, na totalidade, pois nos alongariamos demasiadamente no nosso trabalho. Limitámo-nos a estudar um sector de cada lâmina escolhido ao acaso e onde observávamos as células normais e anormais existentes.

Os resultados numéricos vêm pois referidos a divisões normais e divisões anormais. É possível que, no primeiro grupo, se incluam alguns números que em verdade devam pertencer ao segundo por conterem alterações que, pela sua fraca intensidade, e expressão, nos passassem desapercebidos; mas, precisamente por não haver processo de identificação não havia outro critério a seguir. Demais,

é de esperar que esse número seja reduzido. Nos casos de ruturas, os fragmentos costumam dispor-se na periferia da célula, tornando assim a anomalia visível; nos casos de translocações, sendo mais fácil o erro, não devem estar longe da realidade os números que apresentamos. Os demais casos — pontes, fusos tripolares, células poliploides etc. — a que faremos referência na segunda parte deste capítulo, são em número bastante mais diminuto, e, como regra absolutamente destacáveis e isentos de grande probabilidade de erro.

Procedemos então à aplicação dos raios-X. O primeiro resultado que observámos, quere no material tratado pelo sal de chumbo quere no testemunha, foi o retardamento da actividade mitótica, que nos impediu a fixação de radículas, vinte e quatro horas após a irradiação. É o que nos diz o Quadro IV que resume, dentro do critério atrás exposto, os resultados que se obtiveram. Este retardamento, que tem sido já objecto de diferentes estudos, parece ser devido a alterações químicas no citoplasma, não se sabendo porém, se elas consistem na destruição de qualquer substância promotora da divisão se na produção de qualquer outra, que iniba a acção daquela.

Do 4.º dia em diante a quantidade de células em actividade mitótica surge imensamente reduzida.

Como o nosso objectivo é apenas a verificação do efeito do acetato de chumbo sobre a percentagem de células anormais, provocadas pelos raios-X, construimos o Quadro V, a partir do anterior.

Por ele se vê que, para o ensaio testemunha, a percentagem de divisões afectadas sofre uma estranha quebra no 3.º dia, para depois tornar a subir e, decrescer então de modo normal. No ensaio com chumbo, a variação faz-se sempre em diminuição de valor da percentagem e de uma forma suave e quase normal. Para que os dados do quadro ressaltem bem à vista construiu-se o gráfico I, que nos mostra as curvas de percentagem dos dois ensaios.

Um facto desde logo nos indica: *a percentagem de mitoses anormais, no ensaio feito com acetato de chumbo, é francamente inferior à do ensaio testemunha.* Toda a curva se encontra para baixo da curva de variação de percentagem do ensaio sem o acetato de chumbo. Mais ainda, o sal de chumbo mostra uniformizar

QUADRO IV

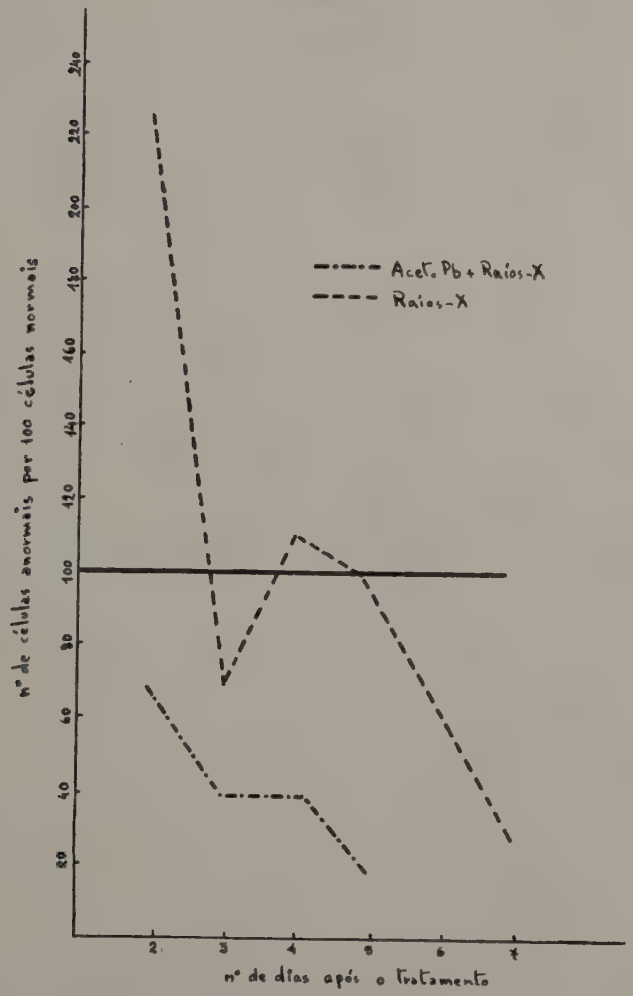
	Fixações efectuadas após a irradiação (5.000 r)															
	1.º dia		2.º dia		3.º dia		4.º dia		5.º dia		6.º dia		7.º dia		Total	
	Divisões		Divisões		Divisões		Divisões		Divisões		Divisões		Divisões			
	normais	anormais	normais	anormais	normais	auormais	normais	anormais	normais	anormais	normais	anormais	normais	anormais	normais	anormais
Testemunha	—	—	97	220	340	238	38	42	2	2	—	—	4	1	481	503
Acetato de Pb	—	—	229	162	162	118	41	17	17	3	—	—	—	—	578	300

QUADRO V

	Número de células anormais por 100 células normais															
	1.º dia		2.º dia		3.º dias		4.º dia		5.º dia		6.º dia		7.º dia		Total	
	n	an	n	an	n	an	n	an	n	an	n	an	n	an	n	an
Testemunhas	—	—	100	226	100	70	100	110	100	100	—	—	100	25	100	105
Acetato de Pb	—	—	100	71	100	41	41	41	100	18	—	—	—	—	100	52

a recomposição das anomalias induzidas, dando-nos o seu gráfico quase uma recta para o representar.

Gráfico I



Os resultados observados são explicáveis. Na realidade, se o acetato de chumbo produz aglutinações, é natural que as soldaduras de quaisquer fragmentos produzidos pela irradiação se dêem com maior frequência, e, ainda mais, que os dois segmentos de

um cromonema separados por uma rutura se soldem de preferência entre si, dificultando a intervenção de qualquer outro fragmento, e, diminuindo, por conseguinte, a percentagem de translocações.

Sendo assim, o que deveríamos observar era uma diminuição nítida da percentagem de fragmentos e leve diminuição da percentagem de translocações. Os resultados que apresentamos nos quadros VI e VII, e, gráficos II e III, que os representam geomètricamente, permitem-nos verificar que, de facto, a percentagem de fragmentos surge diminuida no ensaio em que se empregou o sal de chumbo, mas que a percentagem de translocações parece não sofrer alteração apreciável, ou quando muito, ser levemente aumentada.

As dificuldades em distinguir as translocações de forma a permitir uma contagem total, levam-nos a aceitar o incompleto dos dados obtidos. No entanto, se podemos admitir uma diminuição da sua percentagem, produzida por via indirecta, pela tendência a soldarem-se fragmentos dos mesmos cromosomas, temos também que admitir que, nos demais casos, dando-se maior número de soldaduras, a quantidade de translocações deve vir aumentada.

Os resultados a que chegámos não estão em completa concordância com os de STADLER (1928 b) e MEDVEDEV (1933). Era natural que ao aumento da acção mutacional dos raios-X, verificada por eles, correspondesse um aumento de variabilidade cromosómica. Pelo contrário, o Gráfico I ensina-nos que esta diminui.

Temos, pois, que admitir, para facilitar o ajuste das conclusões, que o acetato de chumbo deve actuar, dum modo a todos os títulos mais directo, pelo seu poder de emissão duma radiação secundária, quando sujeito à acção dos raios-X. As células veriam assim o seu complexo cromosómico não só atacado pelos raios-X, como também por essa irradiação secundária, como pretendem aqueles autores, mas, a acção desta, talvez devido às suas características particulares, *teria que ser essencialmente mutagénica.*

Não podemos, porém, deixar de considerar que o leve aumento de translocações, impedindo a perda de fragmentos, por parte do complexo cromosómico, e, por conseguinte, permitindo a viabilidade de células, que naquele caso seriam possìvelmente eliminadas, possa por este motivo ocasionar o aparecimento de maior número de mutações.

QUADRO VI

	Fragmentos														
	2.º dia			3.º dia			4.º dia			5.º dia			Total		
	N.º de células anormais	N.º de fragmentos	0/0 de fragmectos	N.º de células anormais	N.º de fragmentos	0/0 de fragmentos	N.º de células anormais	N.º de fragmentos	0/0 de fragmentos	N.º de células anormais	N.º de fragmentos	0/0 de fragmentos	N.º de células anormais	N.º de fragmentos	0/0 de fragmentos
Testemunha	220	181	82	238	154	65	42	28	70	2	1	50	542	263	67
Acetato de Pb	162	128	78	118	61	52	17	8	47	3	1	33	363	193	55

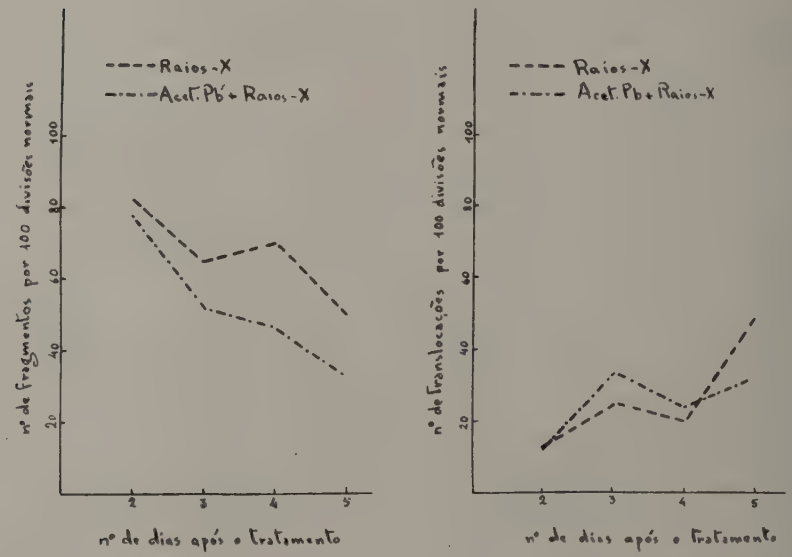
QUADRO VII

	Translocações														
	2.º dia			3.º dia			4.º dia			5.º dia			Total		
	N.º de células anormais	N.º de translocações	0/0 de translocações	N.º de células anormais	N.º de translocações	0/0 de translocações	N.º de células anormais	N.º de translocações	0/0 de translocações	N.º de células anormais	N.º de translocações	0/0 de translocações	N.º de células anormais	N.º de translocações	0/0 de translocações
Testemunha	220	28	13	238	60	25	42	8	20	2	1	50	542	97	18
Acetato de Pb	162	20	12	118	39	33	17	4	24	3	2	33	363	67	18

II Parte — *Aspectos citológicos da acção dos raios-X sobre os cromosomas do* Triticum monococcum *L.*

O interêsse da análise dos aspectos citológicos da acção dos raios-X, na interpretação de problemas filogenéticos (CÂMARA 1935) seria, só por si, bastante para justificar a atenção que o problema nos suscitou e o desenvolvimento que lhe damos neste capítulo.

Gráficos II e III



Porém, como se referiu na Introdução, e se verá mais adiante, essa análise conduz-nos também à explicação doutros aspectos, e, à pesquisa de novos pontos ou temas de discussão.

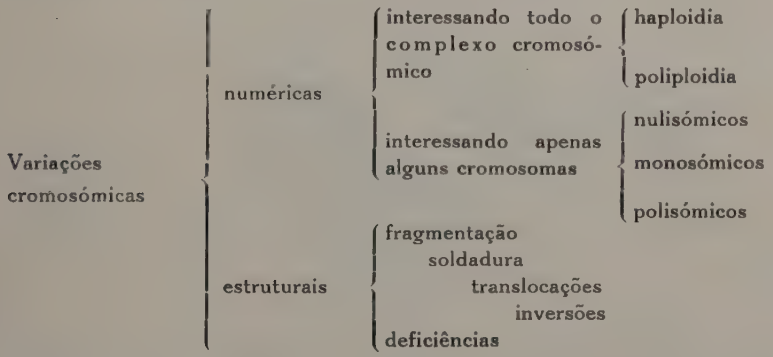
Quando os raios-X actuam sobre as radículas duma planta — no nosso caso o *Triticum monococcum* L. — podem dar origem a frequentes e profundas perturbações mitóticas e aberrações cromosómicas.

Em primeiro lugar, figura um retardamento do ciclo mitótico. Tivemos ocasião de verificar tal efeito que se traduziu por uma falta ou grande diminuição de crescimento, durante as 24 horas seguintes ao tratamento. Na realidade, como se observa no Quadro III, não apresentamos qualquer contagem de divisões no 1.º dia, após a radiação.

Outra alteração, verificada por vários autores, é a diferença de contracção induzida por aquele agente. Queremos crer que este problema seja de maior complexidade do que aquela que se lhe tem atribuido. A ele nos referiremos depois de apresentados os diferentes aspectos citológicos observados, mas, desde já queremos dizer que, estamos convencidos de que esses diferentes graus de contracção devem andar intimamente ligados à actividade dos centrómeros, a qual por enquanto se mantem bastante desconhecida.

Ainda finalmente, tratando das perturbações que os raios-X causam à vida das células, citamos o caso dos fusos tripolares e tetrapolares, ou seja, da desorganização da polaridade das células. Encontrámos tanto uns como outros, no nosso material. Um dos fusos tripolares, impossível de fotografar e de representar por desenho, apresentava-se extraordinàriamente interessante com três pontes ligando os três grupos de cromosomas. Quanto aos fusos tetrapolares pudémos verificar a presença de dois casos, dum dos quais damos o desenho (Fig. 5).

A nossa atenção prendeu-se mais, sobre os casos de aberrações cromosómicas. O quadro seguinte resume as anomalias que os raios-X normalmente induzem, e, que procurámos ver no nosso material.



Variações cromosómicas numéricas

Os casos de variações numéricas encontrados, afectavam apenas células isoladas sem nunca termos observado a sua extensão a qualquer zona do tecido meristemático, por mais pequena que fosse. Como o nosso estudo se restringiu à utilização de radículas,

sem ver posteriores efeitos sobre as plantas adultas, ignoramos o seu comportamento ulterior, e, nem mesmo, se o quizessemos, poderiamos prevê-lo, dada a natureza do trabalho.

Nunca verificámos o aparecimento de células haploides. Apontamo-lo no quadro, porque é possível a haploidia com a ajuda das

Fig. 5

radiações, por esterilização parcial dos grãos de pólen, e, consequente aparecimento, após a polinização, de frutos com sementes contendo apenas *n* cromosomas.

Se o fenómeno da haploidização se não verificou, o mesmo

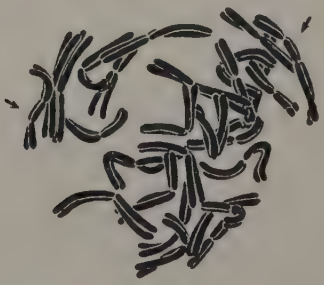


Fig. 6

não sucedeu com o da poliploidização. Por diversas vezes tivémos ocasião de observar células tetraploides, isto é, com 28 cromosomas. Como na técnica de preparação de lâminas, que utilizámos, se empregou o hidrato de cloral, poderiamos ficar, por vezes, na dúvida se a duplicação cromosómica seria motivada por este agente químico, que a pode originar com relativa facilidade, se

pelos raios-X. No entanto, em certos casos, essa dúvida deixa de existir, uma vez que a duplicação da constituição numérica ocorre por processos distintos. O hidrato de cloral pode destruir o fuso e impedir que os cromatídeos, em que os cromosomas se dividem, se afastem para os polos, e, dar assim, origem a uma célula com 28 cromosomas. Teria que passar sobre esta perturbação, todo um ciclo mitótico para que se pudesse observar uma metafase com

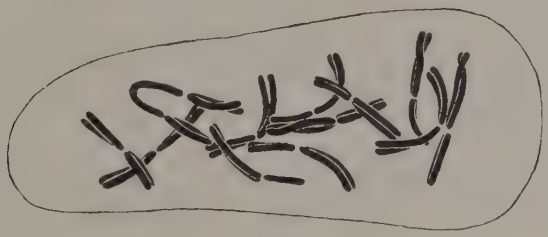


Fig. 7

28 cromosomas, que apresentassem, cada um, dois cromatídeos. Ora o tempo que medeia entre o tratamento com hidrato de cloral e a fixação, não é suficiente para permitir aquele ciclo mitótico; por isso, acreditamos que a presença de 28 cromosomas, já clivados,

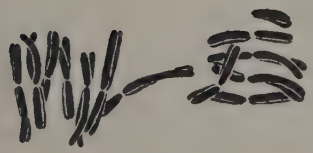


Fig. 8

Fig. 9

é condição suficientemente forte para atribuir aos raios-X a responsabilidade da duplicação cromosómica. A fig. 6 mostra-nos uma células nestas mesmas condições.

Os casos de células com número de cromosomas diferente do normal surgiram com grande frequência, principalmente os de número inferior a 14. Reconhecemos a existência de células com constituições diploides de $2n = 12$, 13, 15, 16 e 17. A fig. 7 apre-

senta-nos uma célula intacta com 13 cromosomas, dois dos quais parecem estar ligados entre si, pelo menos por um cromatídeo. As figs. 8 e 9 mostram-nos, a primeira, uma divisão com 12 cromosomas e um fragmento, e, a segunda, 15 cromosomas, um dos quais parecendo de dimensões bastante mais pequenas que os restantes, e, 2 fragmentos, obtidos por rutura próxima do centrómero dum dos cromosomas SAT.

Podem-se dar diferentes explicações da formação de células nestas condições e, é natural que, na prática, todas elas se verifiquem, umas em maior, outras em menor escala. Pode ser que uma leve e temporária soldadura se tenha originado entre dois cromatídeos dum mesmo cromosoma ou de cromosomas diferentes, levando assim à formação duma ponte que não sofrendo rutura pode resistir, e mercê duma maior potência dum dos polos vir a proporcionar uma não-disjunção de que resultem uma célula com $2n - 1$, e, outra com $2n + 1$, caso a soldadura se venha a desfazer mais tarde. É de admitir, ainda, que tendo sido perturbado nas suas funções, ficando assim o cromosoma retardado na placa equatorial, fosse posteriormente incluido em qualquer núcleo filho, uma vez extinto o efeito do agente externo, e, recuperada a sua potencialidade.

Finalmente, sugere-se o caso mais plausível, e que mais tem sido apontado e defendido, prevendo-se que o centrómero ao sofrer a acção das radiações, tendo perdido a sua capacidade de divisão, originasse a ascenção dos dois cromatídeos do cromosoma para um dos polos, durante a anafase.

O desconhecimento, que ainda hoje prevalece sobre o modo como os centrómeros exercem a sua acção no decorrer da metafase-anafase impede-nos, evidentemente, de tentar interpretar o processo pelo qual os raios-X induzem a perturbação apontada. Queremos acrescentar que, se se desse o primeiro caso, uma vez que para se verificar a soldadura é nessário que tenha havido rutura, deveriam os cromosomas envolvidos no processo apresentar-se deficitários na sua constituição génica — salvo se se verificassem rearranjos mais complexos — e, as plantas tetraploides poderiam mostrar assim uma variação dependente dessa delecção.

Tudo quanto se aplicou à formação de células com $2n - 1$ e $2n + 1$ cromosomas, se poderá extender a constituições diploides de $2n - a$ e $2n + a$ (em que $a < 2n$). Porém, as probabilidade de

ocorrência vão diminuindo à medida que *a* aumenta, o que de resto é fàcilmente compreensível. Só observámos casos diferindo do normal em que *a* era inferior a 4.

A importância, que não se pode esquecer, antes se tem que considerar em destaque, das variações numéricas cromosómicas, induzidas pelo raio-X, é justificada pela possibilidade de obtenção de plantas que apresentem «novas condições genéticas úteis» (CÂMARA, 1935). Naturalmente, a modificação do número de cromosomas pode acompanhar-se de alterações de ordem morfológica e fisiológica que tornem as plantas de maior valor agrícola.

Outro aspecto, que importa considerar, é a obtenção de plantas nulisómicas que tanto interesse apresentam na análise dos grupos de ligamento — haja em vista os trabalhos de SEARS (1941) sobre os trigos — bem como a de plantas polisómicas que podem ajudar a interpretar problemas filogenéticos.

Variações cromosómicas estruturais

Na produção de variações estruturais dos cromosomas podemos considerar dois aspectos fundamentais: fragmentação e soldadura dos fragmentos. Ao modo como o primeiro se efectua fizemos já alusão na Introdução deste trabalho. Trataremos agora do segundo, em confronto com os dados que colhemos no nosso material.

Uma rutura origina duas superfícies que mantêm, cada uma, durante um certo tempo, a *capacidade de reunião*, com qualquer superfície nas mesmas condições. A natureza da aparente atracção que leva à produção de novos rearranjos, mantém-se ainda ignorada, mas o facto é que eles surgem. Da forma como os fragmentos se soldam resultam os diferentes tipos de translocações.

Das roturas e translocações resultam fragmentos *acêntricos* e *dicêntricos*. Nos primeiros não existe centrómero, e, são porções de cromosoma, que não sendo por esse facto chamados para os polos nas anafases, se perdem. Os segundos são os que possuem dois centrómeros, e, como se compreende, apresentam um comportamento distinto dos demais, no ciclo mitótico. Atraídos os dois para um polo, persistirão na metafase seguinte; chamados cada um para o seu polo darão origem a uma ponte primária (fig. 10c) com a consequente rutura, normalmente pelo ponto onde se tenha verificado a fusão. Claro que, poderemos considerar os casos de

policêntricos, mas tanto de ocorrência como persistência muito menor. Os fragmentos acêntricos costumam-se dispôr na periferia da célula, para onde são atirados e mesmo repelidos, provàvelmente pela formação do fuso e afastados portanto da placa equatorial.

As figs. 8, 9, 13, e 16 mostram-nos alguns desses fragmentos provenientes de ruturas pelo centrómero, ou muito próximo dele. Um dos fragmentos, que se pode ver na fig. 9, proveio dum cromosoma SAT, pois apresenta os satélites claramente destacados.

Outros fragmentos, resultantes da acção dos raios-X ao longo de todo o braço, podem observar-se na fig. 10b e na fig. 12, onde o número de ruturas é muito elevado.

a b c

Fig. 10

Sabendo-se que as ruturas se dão de preferência na região centromérica, e, na parte distal dos cromosomas, — pelo menos para algumas espécies, entre as quais se contam as do género *Triticum* (CÂMARA, WAGNER e GARDÉ, 1948, no prelo) — estava indicada a confirmação do facto e, por isso, efectuámos uma contagem que nos deu os seguintes números:

Ruturas na região centromérica	167	29,6 %
Ruturas nas zonas distais	142	25,1 %
Ruturas ao longo das restantes zonas dos cromosomas	256	45,3 %
Total de fragmentos	565	

O facto apresenta-se pois confirmado, dado que as percentagens de 45,3 e 54,7 (29,6 + 25,1) dizem respeito a zonas de extensão muito diferentes, muito mais limitadas para a segunda. Um facto porém pudemos verificar além desse. Nos Trigos diploides, existem para cada quatro cromosomas SAT., dez que não têm função nucleogénica, isto é, uma proporção de 1 para 2,5. Sendo assim, entre os 565 fragmentos, que contámos, 161 deveriam provir dos

cromosomas SAT e 404 dos restantes. Ora nós só observámos uma escassa dezena de fragmentos apresentando satélites. Um desses casos apresenta-se na Fig. 9. Se considerarmos a possibilidade de se operarem ruturas nos fios satelíferos, a perda dos satélites torna impossível a identificação dos cromosomas SAT e, consequentemente, a da origem desses fragmentos. Mesmo assim, aqueles números (10 e 161) são tão dispares que nos levam a pensar numa maior resistência dos cromosomas SAT aos raios-X. O diferente comportamento dos cromosomas a este agente, havia já sido apontado por CÂMARA (1941) que atribuia a um dos cromosomas SAT, uma maior susceptibilidade do que ao outro.

Parece pois que se pode tirar a conclusão de que a resistência dos cromosomas aos raios-X não é a mesma para cada um deles ou, pelo menos, que os cromosomas SAT são mais resistentes que os restantes.

A presença de cromosomas dicêntricos verificou-se com bastante frequência. As figuras 6, 10 a, 11, 12, 13 e 14 mostram-nos alguns exemplos. O dicêntrico da fig. 13 mostra-se especialmente interessante pois resultou dum cromosoma SAT. Quanto aos dois dicêntricos assinalados na fig. 6, que reproduz uma célula tetraploide, parecem ser homólogos, e teriam sido, assim, originados pela duplicação dum dicêntrico, anteriormente formado.

As duas constricções quinéticas tanto se podem apresentar juntas — caso da fig. 14 — como muito afastadas, chegando mesmo o segmento intermédio a ser maior do que qualquer dos dois terminais, (fig. 11). Designaremos estes dois tipos de dicêntrico, respectivamente, por tipo A, e, tipo B. Se bem que não tivessemos desenvolvido, em especial, a nossa atenção neste sentido, pareceu-nos que, à medida que o tempo ia passando sobre a irradiação do material, iam também desaparecendo os tipos de cromosomas *diquinéticos* de segmento mediano maior. Quere dizer, a probabilidade e talvez mesmo a possibilidade de persistência desses cromosomas dicêntricos, aumenta com a proximidade dos dois centrómeros. Tentando interpretar o fenómeno, pensamos que essa proximidade crie um efeito resultante, e que portanto os centrómeros, em última análise, exerçam a sua acção como se fossem um só elemento. Entretanto, os dicêntricos de tipo B, perder-se-iam por serem solicitados para os dois polos, uma vez verificada a diferenciação de polaridade dos centrómeros. Esta mecânica é

explicada no esquema representado pela fig. 17 onde, para maior simplicidade, se representou o cromosoma como um todo, isto é, sem atender aos cromatídeos.

O problema, porém, é susceptível de se apresentar doutro modo. Assim, o predomínio de dicêntricos do tipo A, sobre os de tipo B, poderia ser motivado pela própria transformação destes últimos em formas do primeiro tipo. Durante a metafase verificar-se-ia a torsão dos dois cromatídeos do segmento intermédio, e, provocar-se-ia, assim, na anafase, a rutura, em qualquer dos seus pontos. Se a ela se seguisse nova soldadura o dicêntrico manter-se-ia. A repetição do fenómeno de rutura — soldadura, em gerações sucessivas de células, permitir-nos-ia admitir uma perda gradual de material dos segmentos intermédios e a consequente transformação de tipo de dicêntrico.

Qualquer das duas explicações parece plausível, mas a primeira surge-nos como mais interessante, e, digna de maior investigação.

O aparecimento de policêntricos foi muito menos frequente. No entanto, um caso muito especial, devemos apontar — o de um cromosoma que apresenta quatro constrições. Reproduzido na fig. 14, nele se vêm três longos segmentos separados por dois outros bastante mais pequenos, e, com constrições claramente vincadas. A simetria que o longo cromosoma apresenta para um e outro lado da zona mediana, leva-nos a pensar que ele tenha provindo dum dicêntrico por «sister-reunion» dos seu cromatídeos, também fracturados nas suas extremidades.

Na mesma célula, incompleta, verifica-se a presença dum cromosoma dicêntrico do tipo A e de dois cromosomas aparentemente normais que parecem ter persistido para confronto de tamanhos.

A inversões, caso especial das translocações, que são reconhecíveis em cromosomas de *Drosophila* ou de outro qualquer díptero, não podem, pelo menos por enquanto, com os meios que a citologia tem ao seu alcance, ser observadas em cromosomas mitóticos das plantas. A sua pesquisa ou análise faz-se por processos genéticos fora do alcance do nosso trabalho. Ao citá-las no quadro

anterior nada mais tivemos em vista que referi-las como um dos efeitos do raio-X.

Focaremos, finalmente, as dificiências. Extraordinàriamente difíceis de localizar e interpretar, quando se apresentam intercalares, aparecem normalmente nas zonas distais mas mesmo assim algo difíceis de ver, salvo se afectam uma extensão bastante longa do cromosoma ou cromatídeo. As deficiências, apesar de conduzirem muitas vezes à morte das células, são bastante utilizadas na deter-

Fig. 11

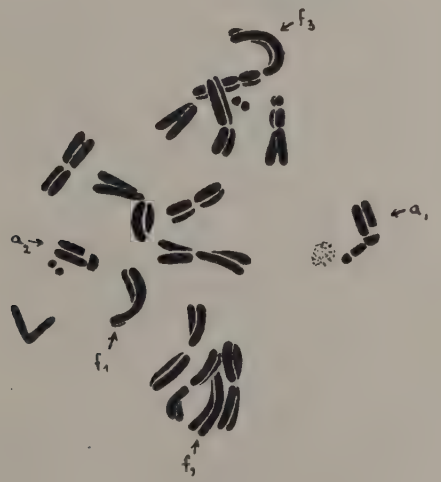


Fig. 12

minação dos loci dos genes e consequente constituição dos mapas cromosómicos.

Nas lâminas que estudámos encontrámos um metafase bastante afectada pela radiação (fig. 12) na qual se observam dois cromosomas (a1 e a2), aparentemente homólogos, apresentando cada qual, num braço, uma deficiência proximal num único cromatídeo, e, no outro braço, parecendo ter sofrido qualquer rutura seguida de soldadura dos dois cromatídeos. Junto ao cromosoma a1, nota-se, ainda, um fragmento que não se pode dizer com segurança se está ou não ligado a ele.

Foi este o único caso em que podemos observar a presença de qualquer delecção intercalar.

Descritas algumas das variações que a acção dos raios-X induz nas células e cromosomas do *Triticum monococcum*, queremos relatar o caso particular de diferenciação na contração dos cromo-

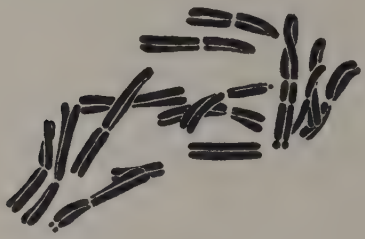


Fig. 13

Fig. 14

somas. Tivemos ocasião de encontrar, nas nossas lâminas, três aspectos caracterizáveis dessa diferenciação:

a) metafases apresentando todos os cromosomas mais encurtados do que o normal;
b) cromosomas, dentro duma mesma célula, com maior grau de distensão que os demais;
c) fragmentos maiores do que os braços de qualquer cromosoma do complexo.

O primeiro aspecto, dado que surge com frequência, quere em condições naturais, quere em materiais que se sujeitaram à acção de agentes que contraiam os cromosomas, como no caso do nosso ensaio, não interessa tanto considerar ou destacar. É para os outros dois que vai a nossa atenção.

Fig. 15

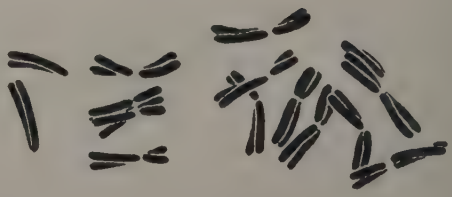


Fig. 16

A fig. 15 mostra-nos, numa metafase incompleta, um longo cromosoma SAT, muito distendido, e, cujas dimensões podem ser confrontadas com os dos restantes.

Como a maior ou menor espiralização parece estar dependente do metabolismo do ácido nucleico, (DARLINGTON, 1947) que é, por sua vez, regulado pelo centrómero, é-nos lícito concluir que o centrómero daquele cromosoma deva ter sido alterado nas suas funções, pelos raios-X. (*)

Deste modo, também longos fragmentos produzidos por rupturas, pelo centrómero, poderão ser modificados na sua espiralização e, por conseguinte, apresentarem dimensões que não correspondam às que esses segmentos teriam se se mantivessem soldados. Casos desses apresentamos nas figs. 11, 12 e 16. Poder-se-ia atribuir o maior comprimento dos fragmentos a soldaduras de outros mais

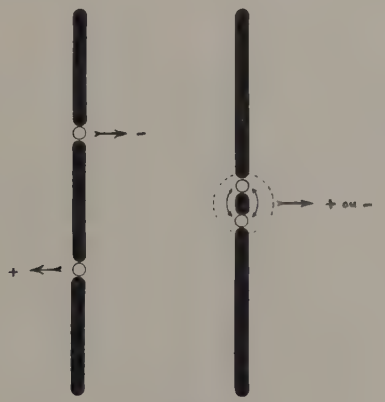


Fig. 17

pequenos, e, isso será natural, principalmente quando se dêem translocações recíprocas.

No entanto, em casos como os da fig. 16, não vemos outra solução que não seja a aceitação da hipótese exposta, isto é, as maiores dimensões desses fragmentos provenham, numa acção indirecta, da perturbação causada no centrómero pela radiação. Nessa figura vemos treze cromosomas normais, e, os dois braços do décimo-quarto apresentando-se nitidamente mais longos do que os restantes.

(*) KOLLER (1947) verificou que quando o centrómero é afectado por um agente externo como o gaz de mostarda, — cuja acção DARLINGTON (1947), assemelha à dos raios-X — não se dá a espiralização total dos cromosomas.

Do que expuzemos sobre (1) os diferentes graus de contracção dos cromosomas ou fragmentos, (2) persistência de dicêntricos de segmento intermédio pequeno, e, (3) formação de células com número de cromosomas diferente do normal, ressalta uma ideia fundamental: a importância do papel que o centrómero desenvolve em todo o processo de reacção por parte dos cromosomas, aos raios-X. Estamos em crer que deva ser o estudo dessa entidade que se deve impôr para a interpretação e resolução de muitos dos problemas que rodam em torno dos raios-X.

CONCLUSÕES

I PARTE

1 — O acetato de Pb, actuando isoladamente, sòmente provoca alterações calimáticas que se traduzem por aglutinações e dissolução parcial ou total da substância matriz.

2 — O prè-tratamento das radículas do *Triticum monococcum* L. com soluções aquosas de acetato de Pb a 1 %, diminue a percentagem total de aberrações cromosómicas induzidas pelos raios-X. A percentagem de fragmentos diminue enquanto que a de translocações se mantém ou sobe ligeiramente.

3 — A radiação secundária do Pb submetido à acção dos raios-X, se for a principal responsável pelo aumento de mutações, como pretendem alguns autores, deverá ter uma *acção essencialmente mutagénica*.

II PARTE

4 — Os cromosomas dicêntricos de segmento intermédio pequeno são mais persistentes que os demais e, admite-se que a proximidade dos centrómeros crie um efeito resultante que os leve a actuar como se fossem um único elemento.

5 — A resistência dos cromosomas do *Triticum monococcum* L. aos raios-X parece não ser a mesma para cada um deles, pelo menos para os cromosomas SAT que são mais resistentes que os restantes.

6 — Os fragmentos acêntricos e até mesmo os cromosomas cujo centrómero foi afectado parecem apresentar uma espiralização

incompleta e por conseguinte maiores dimensões do que as que teriam em condições normais.

7 — Observações directas confirmam a maior susceptibilidade aos raios-X das regiões proximais e distais dos cromosomas. A conclusão anterior levanta porém dúvidas quanto à validade desta determinação.

8 — O centrómero desempenha um papel importante em todo o processo de reacção aos raios-X, por parte dos cromosomas.

AGRADECIMENTOS

Ao terminarmos, desejamos agradecer a todos aqueles que nos ajudaram ou incitaram com o seu trabalho ou conselho.

Queremos em primeiro lugar apresentar os nossos agradecimentos ao Prof. ANTÓNIO SOUSA DA CÂMARA, Director da Estação Agronómica Nacional, onde trabalhámos, por todas as facilidades que nos concedeu, bem como o seu auxílio e orientação.

Igualmente agradecemos a todos os que, nos auxiliaram no trabalho de todos os dias, e, em especial ao Eng.º Agrónomo LUIZ DE AZEVEDO COUTINHO, Chefe do Departamento de Genética daquela Estação.

Pretendemos também deixar aqui expresso o nosso reconhecimento às pessoas e instituições que nos consentiram a utilização dos seus aparelhos de raios-X, permitindo assim a realização do nosso trabalho: ao radiologista Prof. Dr. JOSÉ PEREIRA CALDAS e às secções de radiologia do Instituto Português de Oncologia e do Hospital da Marinha.

SOME CYTOLOGICAL OBSERVATIONS ON X-RAYS ACTION ON *TRITICUM MONOCOCCUM*

SUMMARY

The author makes a survey of the litterature dealing both with natural and artificial radiations and their genetic and cytological effects. X-rays is focused.

The importance of the use of X-rays together with other agencies is discussed, putting special enphasis on chemical substances. The writer in his experiments used lead acetate before X-irradiation; he concluded that:

1 — Lead acetate *per se*, leads only to kalimatic alterations (aglutination and total or partial dissolution of matrix substance).

2 — The supplementary treatment of *Triticum monococcum* root-tips with 1 % aqueous solutions of lead acetate, decreases the total percentage of chromosomic aberrations due to X-rays. Fragment percentage decreases, whereas translocations percentage is not affected or very slightly increased.

3 — The main effect of the secondary radiation of lead submited to X-rays seems to be mutagenic.

Different cases of chromosome aberrations are described — delay of division after treatment, cells with an abnormal number of chromosomes, tri and tetrapolar spindles, fragments, dicentric chromosomes, anaphase bridges, etc.). From these observations the writer concludes that:

4 — The type of dicentrics with the two centromeres very near one another seem to be more persistent than ony other throughout cell division. The writer thinks that perhaps the closeness of the two centromeres may produce an effect leading to their behaviour as a single element.

5 — Resistence of the chromosomes of *Triticum monococcum* L. to X-rays seems to be different for different pairs. SAT chromosomes are the most resistant.

6 — Acentric fragments, and chromosomes with an affected centromere, seem to have a owing to greater length incomplete spiralization.

7 — Direct observations confirme that proximal and distal regions of the chromosomes are the most susceptible ones to X-radiations. Conclusion 6 however raises some doubts as to the validity of thys statement.

8 — The centromere plays a very important part in chromosome reaction to X-rays.

BIBLIOGRAFIA

BAGG, K. J. e LITTLE, C. C.

1924 Hereditary structural defects in the descendants of mice exposed to X-rays. *Amer. J. Anat.*, **33**. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

BAGG, K. J., MAC DOWELL, W. C. e LORD, E. M.

1925 Further experiments with X-rayed mice and their descendants. *Anat. Rec.*, **31** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

BABCOCK, E. B. e COLLINS, J.

1929a Natural ionizing radiation and the rate of mutation. *Nature* **124** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1929b Does natural ionizing Radiation control rate of mutation? *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **15.** (In Timoféeff-Ressovsky 1939).

BAUER, H.

1939 Röntgenausslösung von Chromosomenmutationen bei Drosophila melanogaster I. *Chromosoma*, **1.** 343-390. (in Dobzhansky 1947).

BAUER, H., DEMEREC, M. and KAUFMANN, P. P.

1938 X-ray induced chromosomal alterations in Drosophila melanogaster. *Genetics* **23**: 610-630.

BIRKINA, B. M.

1938 The effect of low temperature on the mutation process in Drosophila melanogaster. *Biologichesky Zhurnal* (Moscow). (in Dobzhansky 1947).

BRUMFIELD, R. T.

1943 Eftect of colchicine pretreatment on the frequency of chromosomal aberrations induced by X-irradiation. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **29,** 190 (in Lea 1947).

BUCHMANN, W., und TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N. V.

1935 Über die Wirkung der Temperatur auf den Mutationsprozess bei Drosophila melanogaster. II Behandlung der Männchen mit Temperaturschocks. *Zeits. für induktive Abst. — u — Vereb.* **70**: 130-132. (in Dobzhansky 1947).

CÂMARA, A.

1935 Efeitos dos raios-X nos cromosomas do *Triticum monococcum* L. *Ann. Inst. Sup. Agron.* **6** (2): 5-36.

1936 Éléments pour l'étude de la fragmentation chromosomique. *Rev. Agron.* **7**: 5-38.

1941 A fragmentação dos cromosomas pelos raios-X, no *Triticum monococcum*. *Actas I Congr. Nac. Cien. Nat.* (2): 247-251.

CÂMARA, A. WAGNER, N. e GARDÉ, A.

1948 Location of breaks induced by X-rays in chromosomes of *Triticum* (no prelo).

CETVERIKOV, S. S.

1929 Vortrag in der Soc. des Natur. de Moscou. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

COUTINHO, L. A.

1942 O «mosaico das leguminosas» agente perturbador da hereditariedade? *Agronomia Lusitana* **IV** (4): 273-292.

D'AMATO, F. and GUSTAFSSON, A.

1948 Studies on the experimental control of the mutation process. *Hereditas* **XXXIV** (1-2): 181-162.

DARLINGTON, C. D. and KOLLER, P. C.

1947 The chemical breakage of chromosomes. *Heredity* **1**: 187-221.

DELAUNAY, L. N.

1930 Die Chromosomen-Aberranten in der Nachkommenschaft von röntgenisierten Ähren einer reinen Linie von *Triticum vulgare albidum* All. *Zschr. f. ind. Abst.-u. Vererb.-Iehre* **55**: 352-355.

1934 Experimentell erzeugte Mutationen bei Weizen. *Verlag Ukr. Akad. f.*

landwirt. Wiss. Pp. — 1-56. (Cited after an abstract by Schterbina in Res. Gen. 10 : 164-165) (in Gustafsson 1947).

DOBZHANSKY, TH.

1947 Genetics and the origin of species. *New York. Columbia University Press.*

EFROIMSON, W. P.

1931 Die transmutierende Wirkung de X-Strahlen und das Problem der genetischen Evolution. *Biol. Zbl.*, **51**. (in Timoféef-Ressovsky 1939).

FONDARD et CABASSON

1939 Influence des rayons X et des ondes courtes. *C. R. Hebd. des Séances de l'Acad. d'Agric. de France* **25**, (13) : 506-509.

FREISLEBEN, R. und LEIN, A.

1943a Vorarbeiten zur züchterischen Auswertun röntgeninduzierter Mutationen. 1. Die in der Behandlungsgeneration (XI) sichtbare Wirkung der Bestrahlung ruhender Gerstenkörner. *Zschr. f. Pflanzenzücht.* **25**: 235-254. (in Gustafsson 1947).

1943b Vorarbeiten zur züchterischen Auswertung röntgeninduzierter Mutationen. II. Mutationen des chlorophyllapparates als Testmutationen für die mutationsauslösende Wirkung der Bestrahlung bei Gerste. *Zschr. f. Pflanzenzücht.* **25** : 255-283. (in Gustafsson 1947).

FRICKE, H. and DEMEREC, M.

1937 *Proc. Nat. Acad. Sci.* **23** : 320-327. (in Kaufmann 1941).

FRÖIER, K., GELIN, O. and GUSTAFSSON, A.

1941 The cytological response of polyploidy to X-ray dosage. *Bot. Not.* (Lund): 199-216. (in Gustafsson 1947).

GAGER, S. C., and BLAKESLEE, A. F.

1927 Chromosome and gene mutations in Datura following exposure to radium rays. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **13**.

GENTER, C. F., and BROWN, H. M.

1941 X-ray studies on *Phaseolus vulgaris. J. Hered.*, **32** : 39-44.

GOLDSCHMIDT, R.

1929 Experimentelle Mutationen und das Problem der sogenannten Parallel--Induktion. *Biol. Zentr.*, **49** : 437-448. (in Dobzhansky 1947).

GOODSPEED, T. H.

1929a The effects of X-rays and radium on the species of the genus Nicotiana. *J. Hered.*, **20**. (in Timoféeff-Resssovsky 1939).

1929b Cytological and other features of variant plants produced from X-raye sex cells of Nicotiana tabacum. *Bot. Gaz.*, **87** : 553-582.

GOTTSCHEWSKY, G.

1934 Untersuchungen an Drosophila melanogaster über die Umstimmbarkeit des Phänotypus und Genotypus durch Temperatureinflüsse *Zeits. f. ind. Abst. — v. — Vereb.*, **67** : 477-528. (in Dobzhansky 1947).

GOWEN, J. W., e GAY, E. H.

1933 Gene number, kind and size in Drosophila. *Genetics*, **18** : 1-31.

GRÜNEBERG, H.

1931 Über die zeitliche Begrenzung genetischer Röntgenwirkungen bei Drosophila melanogaster. *Biol. Zbl.*, **51**. (in Timoféeff-Ressovsky, 1939).

GUSTAFSSON, A.

1942 Mutationsforschung und Züchtung. *Der Züchter* **13**: 57-64. (in Gustafsson 1947).

1947 Mutations in Agricultural Plants. *Hereditas*, **33** (1-2): 1-100.

HANSON, F. B.

1928 The effect of X-rays in producing return gene mutations in Drosophila. *Science*, **67**. (in Timoféeff- Ressovsky 1939).

HANSON, F. B., and HEYS, F.

1930 A possible relation and gene mutation. *Science*, **71**. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

JOLLOS, V.

1931 Genetik und Evolutionsproblem. *Verh. Deuts. Zool. Ges.*, 252-295. (in Dobzhansky 1947).

1939 Further tests of the role of cosmic radiation in the production of mutations in Drosophila melanogaster. *Genetics*, **24**, 113-130.

JOLY, J. and DIXON, H. H.

1929 Cosmic radiations and evolution. *Nature*, **123**. (Timoféef-Ressovsky 1935).

JORDAN, P.

1938 Biological action of radiations. *Radiologia* **2**. 16 (in Lea 1947).

KAUFMANN, B. P.

1941 Induced chromosomal breaks in Drosophila. *Cold Spring Habor Symp. on Quant Biol.* **9**: 82-91.

KAUFMANN, B. P., HOLLAENDER, ALEXANDRE and GAY, HELEN.

1946 Modification of the frequency of chromosomal rearrangements induced by X-rays in Drosophila. I. Use of near infrared radition. *Genetics*, **31**: 349-367.

KAUFMANN, B. P., and HOLLAENDER, ALEXANDER

1946 Modification of the frequency of chromosomol rearrangements induced by X-rays in Drosophila. II. Use of ultra-violet radiation. *Genetics* **31**: 368-376.

KAUFMANN, B. P.

1946 Modification of frequency of chromosomal rearrangements induced by X-rays in Drosophila. III Effect of supplementary treatment at the time of chromosome recombination. *Genetics* **31** (5): 449-453.

KERKIS, J.

1935 Does irradiation of the soma produce mutations in the germcells. *C. R. Acad. Sci.* USSR, **1** (in Timoféef-Ressovsky 1939).

1939 Effect of temperature below 0 ° upon the process of mutation and some considerations on the causes of spontaneous mutation. *C. R. (Doklady) Acad. Sci.* URSS **24**: 386-388. (in Dobzhansky 1947).

LAWROW, P. A.

1935 Einfluss erhöhter temperature auf den Mutations prozess von Drosophila melanogaster. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **4**: 983-992. (in Dobzhansky 1947).

LEA, D. E.

1946 *Actions of radiations on living cells.* Cambridge Univ. Press.

LEA, D. E. and CATCHESIDE, D. G.
1942 The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in Tradescantia. *J. Genetics*, **44**: 216-245.

LEPRINCE-RINGUET, L.
1945 *Les rayons cosmique. Les mésatons*. Albin Michel. Paris.

LEVAN, ALBERT
1945 Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. *Nature*, **156**: 751.

LEWITSKY, G. A and ARARATIAN, A. G.
1931 Transformations of chromosomes under the influence of X-rays. *Bull. App. Bot.*, **27** (1): 265-303.

LEWITSKY, C. and SIZOVA, M.
1935 Further studies on regularities in chromosome transformations in Crepis capillaris induced by X-rays. *Comp. rend. Acad. Sci.* URSS. **4** (1-2) 71-75. (in Câmara 1941).

LINDSTROM, E. W.
1933 Hereditary radium-induced variations in the tomato. *J. Hered.* **24**: 129-137.

MAC ARTHUR, J. W.
1934 X-ray mutations in the tomato. *J. Hered.* **25**.

MAC DOUGALL, M. S.
1928 Modifications in Chilodon uncinatus produced by ultra-violet light. *Science*, **67**.
1929 Modifications in Chilodon uncinatus produced by ultra-violet radiation. *J. of exper. Zool.*, **54**. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

MAKHIJANI, J. H.
1944 The ineffectiveness of temperature in influencing the production of mutations by X-rays. *Bombay University Journal* **13** (16): 1-13 (in Lea 1946).

MARSHAK, ALFRED
1938 Chromosome aberrations induced by X-rays, and the effect of ammonia. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **38** (5): 705-713. (in Lea 1947).

MAVOR, J. W.
1929 The effect on crossing-over and nondisjunction of X-raying the anterior of Drosophila pupae. *Genetics*, **14** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

MEDVEDEV, N. N.
1933 Production of mutations by the combined action of X-rays and salts of haevy metals in Drosophila melanogaster, *C. R. (Dokl.) Acad. Sci URSS.* N. S. 230-236.
1935 The contributory effect of cold with irradiation in the production of mutations. *C. R. Acad. Sci. USSR.*, **4** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

MULLER, H. J.
1927 Artificial transmutation of the Gene. *Science*, **66**: 84-87.
1928a The production of mutations by X-rays. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **14**: 714-726.
1929b The measurement of the gene mutation rate in Drosophila. *Genetics*, **13**.

MULLER, H. J.

1940 An analysis of the process of structural change in chromosomes of Drosophila. *J. Genetics.*, **40**: 1-66.

1945 The non-equivalence of the blocks and the salivary « heterochromatin ». *Genetics*, **30** (1): 15.

MULLER, H. J. and GERSHENSON, S. M.

1935 Inert regions of chromosomes as the temporary products of individual genes. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **21**: 69-75.

MULLER, H. J., and MOTT-SMITH, L. M.

1930 Evidence that natural radioctivity is inadequate to explain the frequency of natural mutations. *Proc. Nat. Acd. Sci. U. S. A.* **16**: 277-284.

MULLER, H. J., RAFFEL, D., GERSHENSON, S. M. and PROKOFYEVA-BEGOVSKAYA

1937 A further analysis of loci in the so-called «inert region» of the X chromosome of Drosophila *Genetics* **22**: 87-93.

MÜNTZING, A.

1941 Differential response to X-ray treatment of diploid and tetraploid barley. *Kungl. Fysiogr. Sällsk. Lund Förhandl.* **11** (6): 1-10. (in Gustafsson 1947).

NADSON, G. A.

1925 Sur l'accélération de temps de la vie sous l'influence des rayons X et du Radium. *C. R. Soc. Biol. Paris* **93** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

NADSON, G. A. et PHILIPPOV, G. S.

1925 Influence des rayons X sur la sexualité et la formation des mutantes chez les champignons inférieurs. *C. R. Soc. Biol.* Paris **93** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

OLSON A. R. and LEWIS G. N.

1928 Natural radioactivity und the origin of especies. *Nature*, 121.

PATTERSON, J. T.,

1928 The effects of X-rays in producing mutations in the somatic cells of Drosophila melanogaster. *Science*, **68** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1929 The production of mutations in somatic cells of Drosophila melanogaster by means of X-rays. *J. of exper. Zool.*, **53** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

PATTERSON, J. T., STONE, W., BEDICHEK, S., and SUCHE, M.

1934 The production of translocation in Drosophila. *Amer. Nat.*, **68**: 359-369.

PLOUGH, H. H., and IVES, P. T.

1935 Induction of mutations by high temperatura in Drosophila. *Genetics*, **20**: 42-69. (in Dobzhansky 1947).

RANJAN, S.

1940 A preliminary note on the X-ray mutants of Pusa wheat. *Proc. Indian Acad. Sci. Sect.* B, **12**: 62-66.

ROKIZKY, P. F.

1930 Über das Hervorrufen erblicher Veränderungen bei Drosophila durch temperatureinwerkung. *Biolog. Zentralblatt*, **50**: 554-566. (in Dobzhansky 1947).

SAPEHIN, A.

1934 Röntgenmutationen als ein Ursprug von Rassen der landwirtschaftlichen Pflanzen. *Priroda*, **9**: 28-31. (Cited after Res. Gene. 11, p. (60). (in Câmara, 1941).

SAPEHIN, A.

1935 X-ray mutants in durum wheat. *Bot. Z. URSS* **20**: 3-9. (in Gustafsson 1947).

SAX, K.

1938 Chromosome aberrations induced by X-rays. *Genetics*. **23**: 494-516.

1940 An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia. *Genetics*, **25** (1): 41-68.

1942 The mechanisms of X-ray effects on cells. *Jour. Gen. Physiol.*, **25**: 533-537.

1943 The effect of centrifuging upon the production of X-ray induced chromosomal aberrations. *Genetics*, **29**.

SAX, K., and ENZMANN, E. V.

1939 The effect of temperature on X-ray induced chromosome aberrations. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **25**: 397-405.

SAX. K. and MATHER, K.

1939 Analysis of progressive chromosome splitting. *J. Genet.* **37**, 48.

SEREBROVSKY, A. S., AGOL. J. J., SLEPKOFF e ALTSCHULER, W. E.

1928 Erzengung von Mutationen durch Röntgenbestrahlung bei Drosophila melanogaster. *Zurn. Eksper. Biologii*, **4** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

SERRA, J. A.

1944 An attempt at a synthesis of the physiological and cytological concepts of the gene. *Bol. Soc. Brot.*, **19** (2.ª série): 327-369.

SMITH, L.

1936 Cytogenetic studies in Triticum monococcum L. and T. aegilopoides Bal. *Univ. of Miss. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* **248**: 1-38 (in Gustafsson 1947).

1939 Mutant and linkage studies in Triticum monococcum and Triticum aegilopoides. *Univ. of Miss. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* **298**: 1-26 (in Gustafsson 1947).

STADLER, L. J.

1928a Genetic effects of X-rays in Maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **14** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1928b Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*, **68**: 186-187.

1929 Chromosome number and the mutation rate in Avena and Triticum. *Proc. Nat. Acad. Sci. Washington* **15**. 876-881 (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1930 Some genetics effects of X-rays in plants. *J. Heredity* **21** (1): 3-19.

STEIN, E.,

1922 Über den Einfluss von Radiumbestrahlung auf Antirrhinum. *Z. indukt. Abstammgs-lehre*, **29** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1926 Untersuchungen über Radiomorphosen von Antirrhinum. *Z. indukt. Abstammgs-lehre*, **43**. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

STUBBE, H.

1930a Radium — und Röntgenstrahlen als mutationssauslösender Faktor. *Strahlentherapie*, **37**. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1930b Untersuchungen über experimentalle Auslösung von Mutationen bei Antirrhinum majus. I. und II. *Z. indukt. Abstammgslehre*, **56**. (in Timoféeff-Ressovsk 1939).

TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N. W.

1928 Somatische Genovariationen und Rückgenovariationen eines bestimmten Gens unter dem Einfluss der Röntgenbestrahlung. *Zurn. Eksper. Biol.*, **5** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1929 The effect of X-rays in producing somatic genovariations of a definite locus in different directions in Drosophila melanogaster. *Amer. Naturalist*, **63**.

1930 Zur Frage über das Funktionieren der Gene in den Keimzellen. *Zurn. Eksper. Biol.*, **6**.

1931a Die bisherigen Ergebnisse der Strahlengenetik. *Erg. med. Strahlenforschg*, **5**. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1931b Einige Versuche an Drosophila melanogaster über die Art der Werkung der Röntgenstrahlen auf den Mutationsprozess. *Roux Arch. Entwmech.*, **124**. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1939 *Mutabilita sperimentalle in Genetica*. Ulrico Hoefli. Milão.

VERNADSKY, V. I.,

1929 Sur la concentration du radium par les organismes vivants. *C. R. Acad. Sci. USSR., A.* **2** (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

1930 Sur la concentration du radium par les plantes. *C. R. Acad. Sci. USSR.*, A. (in Timoféeff-Ressovsky 1939).

WEINSTEIN, A.,

1928 The production of mutations and rearrangements of genes by X-rays. *Science*, **67**.

WHITING P. W.,

1928 The production of mutations by X-rays in Habrobracon. *Science*, **68**.

1929 X-rays and parasitic wasps. *J. Hered.*, **20**.

SUMÁRIO

DE FLORA LUSITANA COMMENTARII — AD NORMAN HERBARII STATIONIS AGRONOMICAE NATIONALIS 5

Van Soest, J. L. — SUR QUELQUES *TARAXACA* ET *HIERACIA* DU PORTUGAL 6-23

Gardé, Alberto — ANÁLISE DA ACÇÃO DOS RAIOS-X SOBRE OS CROMOSOMAS DO *TRITICUM MONOCOCCUM* L. 25-73